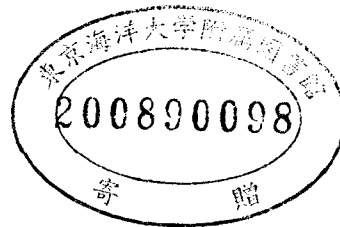


Moritella sp.の有するホスホリパーゼに関する研究

著者	岩崎 純
学位授与機関	東京海洋大学
学位授与年度	2007
URL	http://id.nii.ac.jp/1342/00000909/

修士学位論文

Moritella sp. の有するホスホリパーゼ
に関する研究



平成 19 年度

(2008 年 3 月)

東京海洋大学大学院
海洋科学技術研究科
食機能保全科学専攻

岩崎 純

[博士前期課程]

修士学位論文内容要旨

論文題目

専攻 食機能保全科学専攻

Moritella sp. の有するホスホリパーゼに関する研究 氏 名 岩崎 純

ホスホリパーゼは脂質生化学研究や油脂の製造過程における脱ガム代用法、高機能の乳化剤や人の健康に役立つ生理活性物質の生産への利用が期待される。さらに、低温で優れた活性を示すホスホリパーゼは、タンパク質等の熱に弱い物質との共存下においても用いることができる。そこで、低温で高い活性を有するホスホリパーゼを産生する微生物の探索を行ったところ、海産動物の腸内容物から 10℃ で作用する各種リン脂質分解酵素としてホスホリパーゼ A₁ (PLA1)、ホスホリパーゼ C (PLC)、リゾホスホリパーゼ C (LPLC)、スフィンゴミエリナーゼ C を産生する新規海洋微生物である *Moritella* sp. HFHI0014 株を取得した。本研究では、*Moritella* sp. ホスホリパーゼの産業への応用を目指し、諸性状の解明や培養上清中からの精製を行った。

本ホスホリパーゼの熱安定性と反応生成物の経時変化について調べた。その結果、本ホスホリパーゼは 50℃ 10 分という比較的低い温度で失活することが確認された。これより、本ホスホリパーゼは熱による反応のコントロールが容易であることが示唆された。また、10℃ での HFHI0014 株培養上清と卵黄 PC との反応生成物の経時変化を調べた結果、PLA1 が優先的に作用しリゾホスファチジルコリン (LPC) が生成し、その LPC に LPLC が作用してモノグリセリドに変化していくことが確認された。一方、ジグリセリドの生成は少量であることから、PLC 活性は PLA1 活性に比べて弱いことが確認された。

さらに、透析膜を用いて各種外液で、上清中に含まれるリン脂質分解酵素の安定性を評価した。その結果、他のホスホリパーゼに比べてリン酸緩衝液中では PLA1 の安定性が高いことから、PLA1 の精製を試みた。精製は硫安分画とゲルろ過クロマトグラフィーにより行った。PLA1 の精製の結果、SDS-PAGE において PLA1 活性画分に分子量約 3 万に相当する単一のバンドがみられ、PLA1 の単離に成功した。このバンドの N 末端アミノ酸 20 残基を決定し、BLAST により相同性検索を行ったところ、既知の PLA1 において高い相同性を示すものは無く、本 PLA1 は新規のアミノ酸配列をもつと示唆された。また、精製 PLA1 の熱安定性と反応至適温度を評価したところ、培養上清中と同様の熱安定性を示し、10℃ という低温下で最も強い活性を示すことが確認された。本 PLA1 は現在市販されている *Aspergillus* sp. や *Fusarium* sp. 由来の PLA1 とは異なる熱安定性を示し、食品加工において新たな用途での応用が期待される。

目次

第1章 緒言	1
1-1 ヘルスフードについて	1
1-2 リン脂質と酵素	2
1-3 リン脂質分解酵素	3
1-3-1 ホスホリパーゼ A ₁	3
1-3-2 ホスホリパーゼ A ₂	4
1-3-3 ホスホリパーゼ B	5
1-3-4 ホスホリパーゼ C	5
1-3-5 ホスホリパーゼ D	5
1-3-6 スフィンゴミリン分解酵素	6
1-4 低温酵素の産業への利用	9
1-5 これまでの研究概要	9
1-6 ホスホリパーゼの遺伝子クローニングと工業的生産	18
1-7 本研究の目的	18
第2章 HFHI0014 株培養上清の諸性状	20
2-1 序論	20
2-2 実験方法	20
2-2-1 培養上清の調製	20
2-2-2 培養上清と卵黄 PC との反応における反応生成物の経時変化	20
2-2-3 基質特異性	23
2-2-4 天然由来リン脂質の加水分解特性	24
2-2-5 培養上清中 PLA1 の反応速度	25
2-2-6 熱安定性	26
2-2-7 4℃における安定性	26
2-2-8 培養上清の分子量分画	26
2-3 結果・考察	27
2-3-1 培養上清と卵黄 PC との反応における反応生成物の経時変化	27
2-3-2 基質特異性	30
2-3-3 天然由来リン脂質の加水分解特性	33
2-3-4 培養上清中 PLA1 の反応速度	35
2-3-5 熱安定性	37
2-3-6 4℃における安定性	38
2-3-7 培養上清の分子量分画	39

第3章 培養上清中からのリン脂質分解酵素の精製	40
3-1 序論	40
3-2 実験方法	40
3-2-1 各種溶液中における安定性	40
3-2-2 培養上清の硫安分画	41
3-2-3 ゲルろ過クロマトグラフィーによる精製	41
3-2-4 SDS-PAGE による分析	42
3-2-5 N末端アミノ酸配列分析および相同性検索	42
3-3 結果・考察	43
3-3-1 各種溶液中における安定性	43
3-3-2 培養上清の硫安分画	44
3-3-3 ゲルろ過クロマトグラフィーによる精製	45
3-3-4 PLA1 活性画分の SDS-PAGE による分析結果	48
3-3-5 精製 PLA1 の N 末端アミノ酸配列分析および相同性検索結果	49
3-3-6 精製のまとめ	51
第4章 精製 PLA1 の諸性状	52
4-1 序論	52
4-2 実験方法	52
4-2-1 精製 PLA1 のリン脂質のアシル基への作用位置の確認	52
4-2-2 精製 PLA1 と培養上清の反応速度	53
4-2-3 精製 PLA1 の基質特異性	53
4-2-4 PLA1 と PC との反応に対する PE、PG の影響	53
4-2-5 精製 PLA1 の熱安定性	54
4-2-6 精製 PLA1 の至適温度	54
4-2-7 精製 PLA1 の金属イオンの影響	54
4-2-8 PLA1 活性の安定な精製方法の検討	55
4-3 結果・考察	56
4-3-1 精製 PLA1 のリン脂質のアシル基への作用位置の確認	56
4-3-2 精製 PLA1 と培養上清の反応速度	57
4-3-3 精製 PLA1 の基質特異性	58
4-3-4 PLA1 と PC との反応に対する PE、PG の影響	59
4-3-5 精製 PLA1 の熱安定性	61
4-3-6 精製 PLA1 の至適温度	62
4-3-7 精製 PLA1 の金属イオンの影響	64
4-3-8 PLA1 活性の安定な精製方法の検討	65

第5章 HFHI014 株からの PLA1 をコードする遺伝子の取得検討	66
5-1 序論	66
5-2 実験方法	66
5-2-1 HFHI0014 株のゲノム DNA の抽出	66
5-2-2 既知 PLA1 において相同性の高い配列より作製したプライマーを用いた PCR	67
5-2-3 N 末端アミノ酸配列をもとに作製したプライマーを用いた PCR	69
5-2-4 コスミドライブラリーによる発現スクリーニング	71
5-3 結果・考察	73
5-3-1 HFHI0014 株のゲノム DNA の抽出	73
5-3-2 既知 PLA1 において相同性の高い配列より作製したプライマーを用いた PCR	74
5-3-3 N 末端アミノ酸配列をもとに作製したプライマーを用いた PCR	75
5-3-4 コスミドライブラリーによる発現スクリーニング	77
第6章 総括	79
参考文献	83
謝 辞	89

略語表

・ PLA1	ホスホリパーゼ A ₁
・ PLA2	ホスホリパーゼ A ₂
・ PLB	ホスホリパーゼ B
・ PLC	ホスホリパーゼ C
・ PLD	ホスホリパーゼ D
・ LPLC	リゾホスホリパーゼ C
・ SMaseC	スフィンゴミエリナーゼ C
・ PC	ホスファチジルコリン
・ PE	ホスファチジルエタノールアミン
・ PG	ホスファチジルグリセロール
・ PS	ホスファチジルセリン
・ PI	ホスファチジルイノシトール
・ LPL	リゾリン脂質
・ LPC	リゾホスファチジルコリン
・ 1-acyl LPC	1-アシルリゾホスファチジルコリン
・ 2-acyl LPC	2-アシルリゾホスファチジルコリン
・ SM	スフィンゴミエリン
・ FA	脂肪酸
・ TG	トリアシルグリセロール
・ DG	ジアシルグリセロール
・ MG	モノアシルグリセロール
・ PUFA	高度不飽和脂肪酸
・ DHA	ドコサヘキサエン酸
・ EPA	エイコサペンタエン酸
・ DTT	ジチオスレイトール
・ GLC	ガスクロマトグラフィー
・ TLC	薄層クロマトグラフィー

第1章 緒言

1-1 ヘルスフードについて

近年、我が国における食の欧米化及び高齢化社会の進展により、生活習慣病の増加が問題となっている。生活習慣病を増加させる主要因であるバランスの悪い食生活や精神的なストレスを伴う社会環境の中で、健康に生きていくために重要なことは悪くなった病気を治す「治療医学」よりも、病気になる時期を遅らせる「予防医学」である。また、生命そのものに影響はないものの、より高次元の健康や美容、QOL(生活の質)の向上等への需要も高まっている。このような状況における問題は緊急かつ重要な課題であると考えられる。例えば、肥満、Ⅱ型糖尿病、高血圧、高脂血症などの生活習慣病が重複している病態であるメタボリックシンドロームが近年問題視されている¹⁾。平成16年の国民健康・栄養調査²⁾によると、メタボリックシンドロームに深く関係している上半身肥満(内臓脂肪型肥満)の疑いのある20歳以上の人(BMI ≥ 25 kg/m² 男性:腹囲 ≥ 85 cm、女性:腹囲 ≥ 90 cm)の割合は、男性29.3%、女性14.2%であった。年齢別で見ると、男性では50～59歳で最も高く34.4%、20～29歳で最も低い18.9%であり、女性の場合、年齢とともに上半身肥満の疑いのある割合は高くなっている。このように、多くの人がメタボリックシンドロームの疑いがあるが、その原因は食べ過ぎによるエネルギーの過剰摂取、運動不足、ストレスなど生活習慣によるものである。メタボリックシンドロームの予防には食生活の改善や医療、運動不足の解消が必要となるが、現代の食環境や社会環境においては実践することが困難であり、予防には生活習慣の改善以外の要素が必要となる場合が多い。

このような問題に対応するものとしてヘルスフード(健康食品)があげられる。ヘルスフードは脂質、糖質、タンパク質、ビタミン、ミネラル、食物繊維を含む六大栄養素のみでは必ずしもヒトの健康を維持できるものではない現代において必要とされるプラスアルファの栄養素と定義づけられ、「予防医学」に必要な栄養成分をさす³⁾。ヘルスフードの機能には、生活習慣病や認知症の予防、ストレスの軽減、運動および脳機能の向上、美容の保持などがあり、これに対応する食品としては特定保健用食品やQOL改善食品、医療用食品、美容食品などがある。こういった食品に用いられる素材はヘルスフードの要件として、(1)科学的な有効性が証明されていること、(2)安全であること、(3)作用メカニズムが解明または推定されていることの3点が十分に確保されていることが求められる⁴⁾。

ヘルスフードに用いられる素材の多くは植物や海産動物などの生物由来のものが多い。植物性由来のヘルスフード素材には大豆イソフラボン⁵⁾やカテキン⁶⁾、イチョウ葉エキス⁷⁾などが、海産動物由来の素材には、DHAやEPA⁸⁾など数多くあり、特定保健用食品に頻繁に用いられている。このような天然物のみならず、酵素の作用により天然物の機能改善がなされ、ヘルスフードに応用される素材もある。例えば、ミルクカゼインからトリプシンの作用により生産されるミルクペプチド⁹⁾やかつお節からサーモライシンの作用により生産されるかつお節オリゴペプチド⁹⁾などがヘルスフードとして利用されており、酵素を用いてヘルスフード素材の機能性および多様性の向上がなされている。このように、現在までにヘルスフード

に用いられる機能性素材の報告は多くあるが、予防医学の更なる発展のためには、今後もヘルスフードの要件を満たすより多くの機能性食品素材が必要となる。そのためには、天然物からの生理活性物質のスクリーニングや天然物の機能改善をもたらす酵素の探索を行っていくことが重要である。

本研究では、予防医学の更なる発展を目指し、ヘルスフードに対応する機能性食品素材の開発を目的として、機能性食品素材の中でも近年ヘルスフードとして研究が行われてきているリン脂質¹⁰⁾に着目した。さらに、リン脂質はリン脂質分解酵素により改質することで様々な生理活性を有する構造リン脂質を生産することができ、リン脂質分解酵素によりリン脂質の多様性は向上する。しかしながら、現在産業に利用可能なリン脂質分解酵素の多様性は多くなく、リン脂質の機能性向上は十分に行われていない。そこで、リン脂質の機能性および多様性の更なる向上を目指し、産業に利用可能な新たなリン脂質分解酵素に着目した。

1-2 リン脂質と酵素

リン脂質は生体膜の主要構成成分であり、卵黄や大豆に大量に存在し¹¹⁾、諸産業に広く利用されている。この他にも近年、水産物由来のリン脂質に関しても「マリンビタミン」として着目され利用されるようになってきている¹⁰⁾。天然のグリセロリン脂質は食品産業や様々な工業で利用されている。そして、その用途としては天然物由来の乳化剤としての利用が多い。また、ホスファチジルコリン(PC)やホスファチジルセリン(PS)等のリン脂質は脳機能低下防止¹²⁾や肝機能改善¹³⁾、持久力を養う栄養剤¹⁴⁾等様々な用途でヘルスフードとして利用され、この他にも認知症^{15~17)}、記憶障害¹⁸⁾、パーキンソン病¹⁹⁾、ADHD(注意力欠損多動性障害)²⁰⁾、うつ病²¹⁾、てんかん²²⁾、アレルギー²³⁾などの改善効果や睡眠増加²⁴⁾などの効果があると報告され、その用途拡大が期待される。さらに、より生理機能を高めた sn-1 位に中鎖脂肪酸をもつ構造リン脂質が作成されている²⁵⁾。リン脂質は天然由来の食品用乳化剤としても利用され、卵黄由来リン脂質や大豆由来リン脂質はマヨネーズやパンなどの製造に欠かすことのできないものである。

このようなヘルスフードを含めた食品加工において有用なリン脂質はホスホリパーゼなどのリン脂質分解酵素により改質することで新たな機能性を有することが期待される。ホスホリパーゼはグリセロリン脂質のエステル結合を加水分解する酵素であり、作用するエステル結合の位置によって一般的に A₁、A₂、B、C、D の 5 種類に分類される。ホスホリパーゼの作用部位を図 1-1 に示した。また、ホスホリパーゼの作用によって生じる生成物を表 1-1 に示した。ホスホリパーゼは脂質生化学研究に用いられるほか、工業的には食品や医薬品、化粧品の製造などに用いられており、それぞれに工業的な利用価値がある。これらのホスホリパーゼが代表的なグリセロリン脂質であるホスファチジルコリン(PC)に作用して得られる生成物を表 1-1 にまとめた。

ホスホリパーゼによりリン脂質を改質することで得られる生成物には食品加工において有用なものが多い。例えば、ホスホリパーゼ A₁(PLA1)(EC 3.1.1.32)および A₂(PLA2)(EC 3.1.1.4)により生産されるリゾリン脂質がある。リゾリン脂質はグリセロリン脂質の sn-1 位

もしくは sn-2 位の脂肪酸 (FA) のエステル結合が加水分解され生成したものである。リゾリン脂質は通常のリン脂質よりも高い界面活性²⁶⁾を有することが知られており、食品加工や動物用飼料の生産、化粧品、薬剤の調製に界面活性剤として用いられてきた。リゾリン脂質による水中油型(O/W)エマルジョンは広い範囲の pH および温度で安定であり、マグネシウムイオンやカルシウムイオンの存在下で安定である²⁷⁾。この他にもリゾリン脂質は Caco-2 細胞でのカロテノイドの取り込みを高める作用²⁸⁾やリゾリン脂質の誘導体による破骨細胞の分化及び骨吸収の抑制作用²⁹⁾、アルブミン結合飽和型もしくは高度不飽和脂肪酸結合型のリゾリン脂質の取り込みはラットの脳や高度不飽和脂肪酸(PUFA)が多量に含まれた組織の急速な発育を促す³⁰⁾などの報告がある。

さらに、前述したような生理作用をもつ PS の製品は主にホスホリパーゼ D (PLD) により生産されている。PLD はリン脂質の塩基交換作用をもつ。天然物中に存在する PS 量は微量であるため、PS の生産は天然に豊富に存在する PC から PLD の極性基転移反応によって行われている。

また、ホスホリパーゼは機能性脂質を生産する以外にも精油工程におけるリン脂質を除去する脱ガム工程への応用がされている。脱ガムに應用されているホスホリパーゼは PLA1 および PLA2 であり、リン脂質をリゾリン脂質に改質することで水和性を高め、効率の良いリン脂質の除去が可能となる。このホスホリパーゼによる酵素脱ガム法はヘキサンなどを用いた一般的な化学的な脱ガム法に比べて油脂の損失が少なく、水処理が必要ないので経済性に優れている。また、酵素自体は生分解性の素材であり、また水処理による環境負荷も低減できる³¹⁾。このホスホリパーゼを用いた脱ガム法は EnzyMax と命名され³²⁾、現在 *Fuzarium* sp. 由来 PLA1 などが実用的に用いられている。

このようにリン脂質分解酵素によりリン脂質を改質することで、生理作用を持つリン脂質を効率的に生産することや新たな機能を付加することが期待され、食品生産において天然由来リン脂質には無い多様性を生み出すことができる。さらに、リン脂質分解酵素は機能性リン脂質を生産する以外にも精油工程における脱ガムなどに利用され、広範囲の食品加工に應用可能である。そこで、リン脂質のヘルスフードを含めた食品生産全般における新たな用途の開発を行うことを目的とし、リン脂質分解酵素に関する研究を行った。

1-3 リン脂質分解酵素

1-3-1 ホスホリパーゼ A₁

PLA1 はグリセロリン脂質の sn-1 位のエステル結合を加水分解する酵素であり、2-アシルリゾリン脂質と遊離脂肪酸を生成する。PLA1 によって生産された 2-アシルリゾリン脂質は新たな乳化剤やヒトの予防医学上で多様な生理活性を有する物質として期待されている。

リゾリン脂質にはグリセロリン脂質の sn-1 位のエステル結合を PLA1 の作用によって加水分解されて生産される 2-アシルリゾリン脂質と sn-2 位のエステル結合をホスホリパーゼ A₂ (PLA2) の作用によって生産される 1-アシルリゾリン脂質がある。主に工業的に利用され

ているリゾリン脂質は豚膵臓由来の PLA2 により生産されている。しかしながら、PLA1 によって生産された 2-アシルリゾリン脂質によるエマルションは、PLA2 によって生産された 1-アシルリゾリン脂質によるエマルションより油相分離率が著しく低く乳化安定性が優れているということが知られており³³⁾、PLA1 の新たな工業用酵素としての利用が期待される。

自然界に存在するグリセロリン脂質の脂肪酸組成としては、sn-1 位の部分に飽和脂肪酸、sn-2 位の部分に PUFA がエステル結合していることが多い。さらに、ホスホリパーゼはトリアシルグリセロール (TG) を加水分解せず、基質中に TG が存在している状況下においてもジアシルグリセロール (DG) やモノアシルグリセロール (MG) が生成されることはなく、これらの物質によってリン脂質の加水分解反応生成物であるリゾリン脂質の生成は阻害されないと考えられる。このためドコサヘキサエン酸 (DHA) 等の PUFA が結合したリン脂質の濃縮は PUFA 抵抗性リパーゼによっても行うことが可能である³⁴⁾が、やはり TG 等の他の脂質が混在した状態ではリン脂質を特異的に加水分解することは PLA1 無しには不可能である。このため、食品中の TG と共存しているリン脂質を直接加水分解し、DHA を濃縮するには PLA1 が必要であると考えられる。グリセロリン脂質を PLA1 により加水分解することにより生成された 2-アシルリゾリン脂質は脳機能改善、抗腫瘍、抗炎症作用、血中脂質改善等、ヒト予防医学上有用である DHA⁴⁾等の PUFA の働きとグリセロリン脂質の生体内の脂質低下、肝機能改善、脳機能改善等さまざまな生理化活性の機能を併せ持つハイブリッド素材として新たな生理活性を発揮することが期待される。この他にもリン脂質の脂肪酸分子内分布の解析や脂質生化学研究用の酵素試薬としての利用も期待される。

リゾリン脂質には以上のような有用性があり、その中でも 2-アシルリゾリン脂質は乳化剤への利用やヘルスフードとしての利用の二面性の利用が期待される。

PLA1 は動物の膵臓や肝臓、微生物に存在し、PLA2 と共にリン脂質の代謝回転に寄与している。これまでに知られているそれ以外の PLA1 の分離源としては、*Aspergillus oryzae*³⁵⁾、*Aspergillus fumigatus*³⁶⁾、*Escherichia coli*³⁷⁾、*Serratia* sp. MK1³⁸⁾、*Serratia liquefaciens*³⁹⁾、スズメバチ⁴⁰⁾、ウシの脳、精巣⁴¹⁾、ブタ血小板細胞膜⁴²⁾などが挙げられる。また、少数ではあるが、*Moritella marina* や *Pseudoaltheromonas* 属⁴³⁾、*Psychrobacter* 属⁴⁴⁾等の DHA 産生菌からも PLA1 活性が発見されている。近年、*Aspergillus* sp. の糸状菌からの PLA1 の調製方法が開発されたが、培養に長時間を要する³⁵⁾。また、PLA1 の精製品及び市販品はこの *Aspergillus* sp. や *Fusarium* sp. によるものしか現在はなく、供給源の多様性がない。このため、リン脂質の sn-1 位の改質のためにより優れた PLA1 が求められている。

1-3-2 ホスホリパーゼ A₂

PLA2 はグリセロリン脂質の sn-2 位のエステル結合を加水分解する酵素であり、1-アシルリゾリン脂質と遊離脂肪酸を生成する。PLA2 はアミノ酸配列のホモロジーやその酵素の特徴により、分泌型 PLA2、細胞質 PLA2、Ca²⁺非依存性 PLA2 の 3 つに大別される。さらに、その 3 つのグループは I ~ X I までの 11 グループに分類されている⁴⁵⁾。PLA2 の供給源としては豚の膵臓や人の滑膜液、蛇の毒、*Streptomyces violaceoruber* などが報告されている。

PLA2 は主に製油工程における脱ガム⁴⁶⁾等に利用されるとともに、真核細胞のシグナル変換機能⁴⁷⁾や細菌感染における毒性要因であること^{48,49)}など生体内における役割等においても盛んに研究が行われている。また、PLA2 により生産された 1-アシルリゾリン脂質は主に食品用乳化剤及び化粧品用乳化剤として利用されている。

1-3-3 ホスホリパーゼ B

ホスホリパーゼ B (PLB) はグリセロリン脂質のグリセロ骨格に結合している sn-1 位及び sn-2 位の脂肪酸の両方を同時に加水分解する酵素であり、脂肪酸とグリセロールリン酸を産生する。この酵素の分類はリゾホスホリパーゼと混同されていることが多い。リゾホスホリパーゼ活性は様々な組織で見出されており、加水分解やエステル化、エステル交換反応を行うものなど様々なものが認められている。このリゾホスホリパーゼは PLA1 や PLA2 と共存していることが多く、PLA1 を工業用として用いる場合にはこのリゾホスホリパーゼとの分離もしくはリゾホスホリパーゼ活性の抑制もしくは不活化する条件の検討が必要である場合もある⁵⁰⁾。しかし、これらの酵素によって産生されたグリセロホスホコリンは脳血管性痴呆やアルツハイマー型痴呆等の改善効果が知られている⁵¹⁾。

1-3-4 ホスホリパーゼ C

ホスホリパーゼ C (PLC) はグリセロリン脂質のグリセロールリン酸エステルを加水分解する酵素であり、リン酸塩基と DG を生成する。PLC には多様性があり⁴¹⁾、いくつかのアイソザイムの存在が確認されている。各アイソザイムは互いに一次構造や組織分布が異なり⁵²⁾、また単一細胞に複数のアイソザイムが同時に発現していることが明らかにされている。PLC のアイソザイムとしては現在までに、 α 、 β 、 γ_1 、 γ_2 、 δ の 5 種類の cDNA の同定が行われ、塩基配列から一次構造が決定されている^{53,54)}。これまでに知られている PLC の供給源としては、*Bacillus cereus*^{55,56)}、*Streptomyces antibioticus*⁵⁷⁾、*Pseudomonas fluorescens*⁵⁸⁾、*Clostridium perfringens*⁵⁹⁾などがある。PLC は精油工程における脱ガム工程への利用に関する研究が行われており、PLC のリン脂質に対する作用で生じるリン酸残基は水溶性が高く、その除去が簡単であり、DG が油脂とともに留まり損失を減らすことにより脱ガム化を効率よく行うことができると期待されている⁶⁰⁾。また、真核細胞の代謝における調節など生化学的な研究も行われている⁶¹⁾。

1-3-5 ホスホリパーゼ D

ホスホリパーゼ D (PLD) はグリセロリン脂質のリン酸基エステルを加水分解し、ホスファチジン酸と塩基を生成する。PLD はホスファチジン酸の生産やホスファチジルコリンからの塩基交換反応によるホスファチジルセリンの生産⁶²⁾等に利用されており、この酵素に関しても生化学的な研究が盛んに行われている。

1-3-6 スフィンゴミリン分解酵素

スフィンゴミエリン分解酵素としては、スフィンゴミエリン (SM) をセラミドとホスホコリンに分解するスフィンゴミエリナーゼ C (SMaseC) 活性とコリンと *N*-アシルスフィンゴシルホスフェートに分解するスフィンゴミエリナーゼ D が知られている。スフィンゴミエリナーゼの作用部位を図 1-2 に示した。また、スフィンゴミエリナーゼの作用によって生じる生成物を表 1-1 に示した。

SMaseC の作用によって生産されるセラミドは保湿成分として化粧品などに利用されている。SMaseC の生産源としてはヒトの胎盤⁶³⁾やウシ胎仔血清、*Staphylococcus aureus*⁶⁴⁾、*Bacillus cereus*⁶⁵⁾などが報告されている。現在、特許として *Bacillus cereus* 由来の SMaseC による赤血球中の SM からセラミドを製造する方法が提案されている⁶⁶⁾。

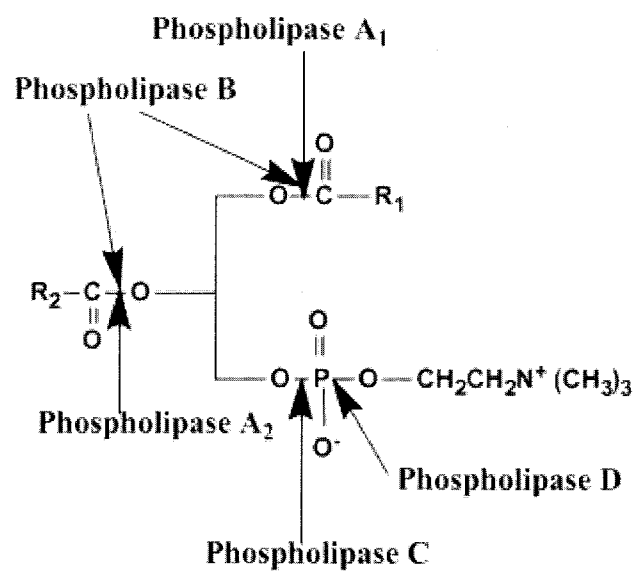


図 1-1 ホスホリパーゼの作用部位

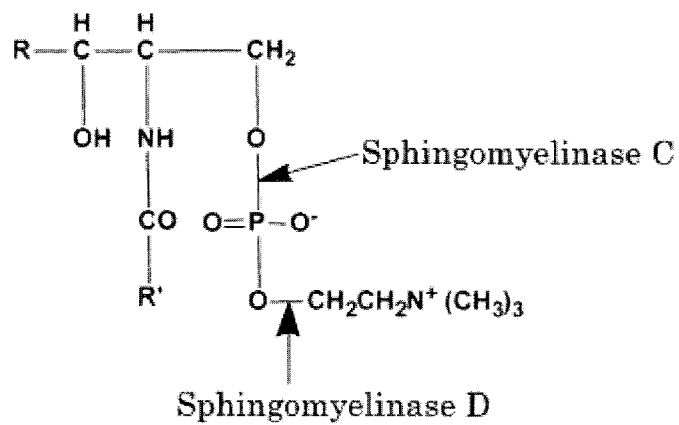


図 1-2 スフィンゴミエリナーゼの作用部位

表 1-1 ホスホリパーゼおよびスフィンゴミエリナーゼによる加水分解反応生成物
(基質が PC および SM の場合)

基質	生成物	作用する酵素
PC	2-アシルリゾホスファチジルコリン+遊離脂肪酸	ホスホリパーゼ A ₁
PC	1-アシルリゾホスファチジルコリン+遊離脂肪酸	ホスホリパーゼ A ₂
PC	グリセロリン酸+遊離脂肪酸	ホスホリパーゼ B
PC	ジアシルグリセロール+リン酸塩基	ホスホリパーゼ C
PC	ホスファチジン酸+塩基	ホスホリパーゼ D
SM	セラミド+ホスホリコリン	スフィンゴミエリナーゼ C
SM	N-アシルスフィンゴシルホスフェート+コリン	スフィンゴミエリナーゼ D

1-4 低温酵素の産業への利用

低温活性酵素は 0~25℃という低い温度で高い活性を有する酵素であり、気温の低い地域の海産動物や土壌などの超低温下に生育する微生物において低温活性酵素の生産が報告されている。低温で活性を示す酵素の供給源の例としては、北海道近海産ホッケ腸内から分離された *Pseudomonas* sp. PL-4 株の産生する低温活性プロテアーゼ⁶⁷⁾や網走の土壌より分離した *Psychrophilic* 属の生産する低温活性ペクチン分解酵素⁶⁸⁾、メタゲノミクスによって得られた低温活性リパーゼなどが報告されている⁶⁹⁾。低温で高い活性を示す酵素は、低温下での食品加工や化学変換、洗剤用酵素、排水・廃棄物処理などへの利用が期待されている。実際に、洗剤用酵素としてプロテアーゼやリパーゼ、セルラーゼなどが実用化され、広く用いられている。しかしながら、現在、高温域で活性を示す酵素（耐熱酵素）の研究に比べ、低温域（0~10℃）で活性を示す酵素の研究は遅れていると言われており、産業的に利用されている数は多くない。それはホスホリパーゼについても同様であり、低温で高い活性を示すホスホリパーゼの報告は現在のところ少なく、低温下で作用するホスホリパーゼの産業への応用はなされていない。例えば、現在産業にて応用されている豚膵臓 PLA2 や *Aspergillus* sp.由来 PLA1 の至適温度は 37℃以上であり、失活温度は 70℃以上である⁷⁰⁾。高温下では酸化による劣化が起こるリン脂質の改質には低温で働くホスホリパーゼは適している。また、PLA2 は卵黄の改質に用いられているが、卵黄中にはタンパク質を含むため、PLA と卵黄との反応を低温下で制御することでタンパク質の変性を抑えた新たな性質を寄与できることが期待される。また、このように、低温下で作用するホスホリパーゼは食品加工や工業利用において価値の高いものであると考えられる。

1-5 これまでの研究概要

本研究室では、これまでに西原らによって PLA1 産生菌のスクリーニングが行われ、海産生物の腸内より分離した 2677 株から 2 株の PLA1 産生菌を取得した。そのうちの 1 株は *Pseudomonas* sp.と同定され、PLA1 産生菌としての新規性が見られた⁷¹⁾。さらに、取得した *Pseudomonas* sp.の産生する PLA1 は 10℃という低温下で活性を示すことが確認されている。これらの実績から、海産動物腸内容物からのホスホリパーゼ産生菌のスクリーニングを続けることで新たな低温で活性を示すホスホリパーゼを産生する微生物の取得が期待され、ホスホリパーゼの供給源の多様性を広げるとともに食品加工や工業において新たな用途の開発ができると考えられる。

低温で活性を示すホスホリパーゼを産生する微生物の獲得を目指し、様々な地域より海産生物の検体を 67 検体獲得し、これらの検体から約 400 株を分離した。67 検体の採取地および検体名を表 1-2 に示した。これらの菌株の培養上清と卵黄 PC を 10℃で反応させた結果、4 株でリン脂質分解活性が確認された。この 4 株の培養上清と TG として大豆油を反応させた結果、4 株とも TG を分解しなかったことから、リパーゼ活性は存在しないことが確認された。これらの 4 株をリン脂質分解活性を有する菌株として、釧路沖で採取したキチジ (*Sebastes macrochir*) から分離した菌株を HFHI0014 株と、諸磯で採取したイシダイ

(*Oplegnathus fasciatus*) から採取した菌株を HFMC0003 株、HFMC0004 株、HFMB0007 株と命名した。これらの 4 株の PLA、PLC、PLD、LPLC、SMaseC 活性の検出を行ったところ、HFMC0003 株、HFMC0004 株、HFMB0007 株には PLA 活性のみが培養上清中に存在し、HFHI0014 株では PLA、PLC、LPLC、SMaseC が培養上清中に存在した。これらの 4 株の培養上清と合成基質を反応させた結果、表 1-3 のように 4 株全てで培養上清中に PLA1 活性を有することが確認された。

さらに、スクリーニングによって取得したホスホリパーゼ産生菌 4 株から食品への利用性を考え諸性状の解明や培養上清からのホスホリパーゼの精製を行っていく株を選抜するための試験を行った。選抜試験では、4 株が共通して有する PLA1 活性について評価した。まず、培養上清中 PLA1 の熱安定性の評価を行った結果、HFMC0003 株、HFMC0004 株、HFMB0007 株の 3 株は 70℃、10 min の加熱においても PLA1 活性が検出された。また、HFHI0014 株では 50℃、10 min の加熱で PLA1 活性の失活が確認された。この結果から、これらの PLA1 をタンパク質の変性や脂質の酸化を抑制する必要がある食品に応用することを考えた場合に、熱による変性を少なくするためには、耐熱性の高い HFMC0003 株、HFMC0004 株、HFMB0007 株を利用するよりも、耐熱性の低い HFHI0014 株を利用したほうが有用であることが示唆された。次に、卵黄 PC 加水分解の経時的変化を評価した結果、HFMB0007 は 12 h 後から加水分解率は 30~40% で一定になっていた。また、HFMC0004 株および HFHI0014 株では 12 h 後から加水分解率はほとんど 50% を超えていた。加水分解率は sn-1 位及び sn-2 位の FA を完全に加水分解した際の値を 100% として表しており、加水分解率 50% で PLA1 活性としては 100% であると評価しているため、HFMC0004 株および HFHI0014 株由来 PLA1 は 12 時間後ではリゾリン脂質の sn-2 位を加水分解するリゾホスホリパーゼ活性が顕著に現れていると考えられる。しかし、6 h までの反応では加水分解率は 50% を超えていないため、反応時間を短くすることでリゾホスホリパーゼによる LPC の損失は抑えられることが示唆された。また、5℃での培養上清中 PLA1 活性の安定性を評価した結果、4 株とも 72 h 5℃の冷蔵室に放置していても PLA1 活性はほとんど低下していなかった。このことから、培養上清中 PLA1 活性の 5℃での安定性において 4 株に差はほとんどないことが確認された。選抜試験の結果、HFHI0014 株が他の 3 株と比べてタンパク質の変性や脂質の酸化が必要な食品への応用により適した失活温度であること、酵素精製を行う際に適した条件である 5℃での安定性を持つことなどから、HFHI0014 株を今後諸性状の解明および酵素精製を行う株として決定した。また、本研究室の西原らによって取得した *Pseudomonas* sp. HFKI0020 株では、5℃での安定性が低く、選抜した HFHI0014 株培養上清中 PLA1 とは諸性状に違いが見られる。

次に、選抜した HFHI0014 株の同定を行った。さらに、本菌株が上記の低温 PLA1 産生菌等よりも取り扱いが容易であるか否かを判断するために増殖温度特性についても検討した。また、低温 PLA1 産生菌に特徴的である PUFA を有するかを調べるために、菌体脂肪酸組成について評価を行った。この結果、表 1-4 および表 1-5 に示すように、HFHI0014 株は運動性を有するグラム陰性の多形態桿菌であり、グルコースを発酵し、カタラーゼ反応およびオキシダーゼ反応ともに陽性を示した。API キットの判定の結果、HFHI0014 株は硝酸塩を

還元し、アルギニンジヒドロラーゼ活性を示さなかった。また、セロビオースおよびD-マンノースを酸化した。これらの性状は *Moritella* の一般性状に類似すると考えられるが、既知の *Moritella* では性状が一致する種はなかった。以上のことから、HFHI0014 株は新規の *Moritella* sp.であることが示唆された。また、HFHI0014 株 16S rDNA 塩基配列解析及び相同性検索、分子系統解析を行った結果においても、*Moritella marina* などの *Moritella* の 16S rDNA に対し高い相同性を示したが、分子系統樹における HFHI0014 株の系統枝は図 1-3 に示すように *Moritella* のクラスターの外側に単独で位置した。これらのことから HFHI0014 株は新規の *Moritella* sp.であると判定した。温度の増殖に与える影響については、培養温度 10℃では菌の増殖が認められたが、20℃で培養を行った場合には菌の増殖は認められなかった。

以上のように、これまでの研究の結果、低温で作用するリン脂質分解酵素として PLA1、PLC、LPLC、SMaseC を有する(表 1-6)新規の海洋性微生物である *Moritella* sp. HFHI0014 株を取得した。HFHI0014 株はタンパク質の変性や脂質の酸化を抑えることが必要な食品加工に有用であり、酵素精製にも適していると考えられる。また、前述したように、HFHI0014 株培養上清中に存在する PLA1 は乳化剤や生理活性物質の生産や脱ガムなどへの利用、PLC は脂質生化学研究や脱ガムへの利用、LPLC は脂質生化学研究への利用、SMaseC は生成物であるセラミドの化粧品への利用など、それぞれに有用性がある。このため、HFHI0014 株の有する各リン脂質分解酵素を単離することで、それぞれの産業への利用価値は高いと考えられる。

表 1-2 サンプリングにより得たサンプルリスト

採取地（採取年）	検体名
釧路沖（2005）	イバラヒゲ
	コンゴウアナゴ
	キチジ
	シンカイエビ
諸磯（2005）	カサゴ
	イシダイ
八丈島（2005）	アカハタ
	ヒレナガカンパチ
下田（2005）	テングダイ
	ムライソ
三浦（2005）	ウメボシイソギンチャク
	カサガイ
	アオコブダガイ
	ヒラスズキ
伊豆（2005）	イシダイ
東京湾（2005）	サバ

採取地（採取年）	検体名
利尻（2005）	ソウハチ
	ホシガレイ
	エゾメバル
	クロガレイ
	トウガレイ
	マガレイ
	キンカジカ
	スナガレイ
	ホッケ
	アイナメ
	ガヤ
西表島（2005）	海水
	ヒトデ
	ゴンズイ
	ニセクロナマコ
	ウミウシ
	ジャノメナマコ
	オオイカリナマコ
	アオヒトデ
	アオボシヤドカリ
	アカテガニ

表 1-3 HFMC0003 株、HFMC0004 株、HFMB0007 株、HFHI0014 株の培養上清による合成 PC の加水分解反応で生成した LPC および原料 PC の脂肪酸組成 (%) および加水分解率 (%)

(a) LPC および原料 PC の脂肪酸組成 (%)

菌株		C16:0/C18:1		C18:1/C16:0	
		C16:0	C18:1	C18:1	C16:0
HFHI0014	原料 PC	41.6	58.3	55.8	44.2
	LPC	0	100	3.2	96.8
HFMC0003	原料 PC	44.5	55.5	53.6	46.4
	LPC	0	100	2.8	97.2
HFMC0004	原料 PC	45.9	54.1	52.8	47.2
	LPC	2.3	97.7	4.7	95.3
HFMB0007	原料 PC	41.1	43.1	50.9	46.2
	LPC	3.3	91.7	4.7	90.5

反応時間, 13 h; 反応温度, 10℃; ジエチルエーテル, 0.5 ml;
合成 PC, 5.0 mg; 培養上清, 0.5 ml

(b) 加水分解率(%)

菌株	加水分解率	
	16:0/18:1PC	18:1/16:0PC
HFHI0014	55.1	47.0
HFMC0003	42.9	44.9
HFMC0004	27.0	20.8
HFMB0007	24.5	38.6

条件は表 1-3 (a) と同じ

表 1-4 HFHI0014 株の菌学的性状

試験項目		結果
培養温度		10℃
細胞形態		多形態桿菌 (1.0-1.2×2.0-3.0 mm)
グラム染色		—
胞子の有無		—
運動性		+
コロニー形態	培養時間	48 h
	直径	1.0-2.0 mm
	色調	クリーム色
	形	円形
	隆起状態	レンズ状
	周縁	全縁
	表面形状等	スムーズ
	透明度	半透明
	粘稠度	バター様
生育温度試験	20℃	—
	15℃	+w
カタラーゼ反応		+
オキシダーゼ反応		+
グルコースの発酵		+
O/F テスト (酸化/発酵)		+/+
嫌気条件での生育		+

＋：陽性、－：陰性、＋w：弱

表 1-5 HFHI0014 株の生理・生化学性状

テスト項目	結果	テスト項目	結果
硝酸塩還元	+	D-マンニトール	-
インドール産生	-	N-アセチル-D-グルコサミン	-
ブドウ糖 酸性化	-	マルトース	-
アルギニンジヒドロラーゼ	-	グルコン酸カリウム	-
ウレアーゼ	-	n-カプリン酸	-
エスクリン加水分解	-	アジピン酸	-
ゼラチン加水分解	-	dl-リンゴ酸	-
β -ガラクトシダーゼ	-	クエン酸ナトリウム	-
ブドウ糖	-	酢酸フェニル	-
L-アラビノース	-	チトクロームオキシダーゼ	+
D-マンノース	+	キシロース	-
セロビオース	+	グリセロール	-
でんぶん加水分解	-	D-ガラクトース	-

＋：陽性、－：陰性

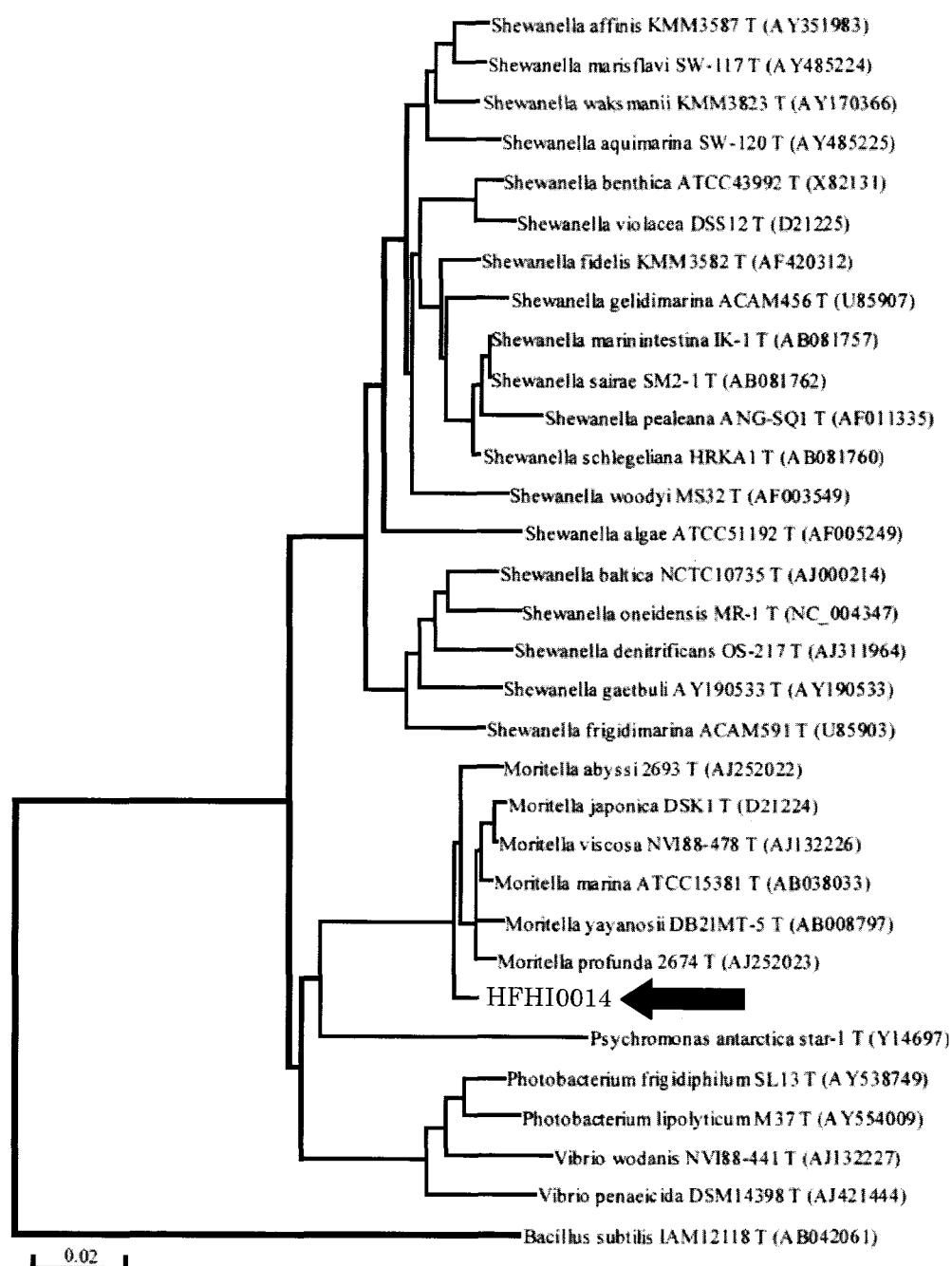


图 1-3 分子系統解析結果

表 1-6 HFHI0014 株培養上清中のリン脂質分解酵素

菌株	PLA1	PLA2	PLC	PLD	LPLC	SMaseC	リパーゼ
HFHI0014	+	-	+	-	+	+	-

※ +：活性あり、-：活性なし

1-6 ホスホリパーゼの遺伝子クローニングと工業的生産

ホスホリパーゼは現在、様々な産業に応用されている。豚膵臓 PLA2 は卵黄の改質やパンの製造、精油工程における脱ガムなどへの応用がなされている⁷²⁾。また、*Aspergillus* sp. や *Fusarium* sp. 由来の PLA1 は脱ガム等に応用され⁷²⁾、*Streptomyces* sp. 由来の PLD はホスファチジルセリン等の生理活性脂質を生産する酵素として実用化されている⁷³⁾。こういった、産業に応用されているホスホリパーゼは精製され、遺伝子クローニングを行った後に、他の宿主菌株中にて大量発現系の検討がなされている。例えば、豚膵臓由来 PLA2 ではクローニングした PLA2 遺伝子を *Aspergillus niger* にて発現させることで、大量発現系を確立した⁷⁴⁾。*Aspergillus oryzae* 由来の PLA1 では精製後アミノ酸配列を解析し、得られたアミノ酸配列よりプローブを作製することで遺伝子クローニングを行い、*Saccharomyces cerevisiae* により発現を確認した⁷⁵⁾。また、この *Aspergillus oryzae* 由来の PLA1 は *Aspergillus oryzae* を宿主とし、PLA1 遺伝子を複数遺伝子内に複製させる遺伝子組換えの手法や糸状状態の改変などにより、60 倍から 7500 倍程度に PLA1 の生産量を向上させることに成功している³⁵⁾。PLD においては *Streptomyces* sp. 由来の PLD の多くが精製され、さらに発現も確認されており⁷⁶⁾、生産量の向上についても検討されている⁷⁷⁾。このように、産業で用いられているホスホリパーゼは精製や他の宿主での発現、大量生産方法の確立が行われたものであり、こうした検討は産業に応用するためには必須であると考えている。

1-7 本研究の目的

前述したように、ホスホリパーゼは工業的には食品や医薬品、化粧品の製造などに用いられており、それぞれに工業的な利用価値がある。また、低温で活性を有するホスホリパーゼは工業的に利用価値があるにも関わらず、現在までに応用されておらず、低温で活性を有するホスホリパーゼの応用は、ホスホリパーゼの新たな用途の開発に寄与すると考えられる。

本研究室で取得した新規の海洋微生物である *Moritella* sp. HFHI0014 株の有する PLA1、PLC、LPLC、SMaseC は前述したように 10℃ という低温下でリン脂質を効率的に改質することが確認されている。

Moritella sp. HFHI0014 株の有するリン脂質分解酵素の諸性状については多くは解明されていない。基質特異性や至適温度などの諸性状を解明することは産業へ応用の効率化と最適な使用方法の選択をする上で不可欠である。また、1-5 でも示したように *Moritella* sp. HFHI0014 株の有するホスホリパーゼを産業に応用するためには精製や遺伝子クローニングおよび酵素の大量発現系の検討は、利便性の向上や低コスト化、安全性の向上などをもたらす。これより本研究では、リン脂質分解酵素の産業への応用性の向上を目指し、*Moritella* sp. HFHI0014 株の有するリン脂質分解酵素の諸性状の解明および各リン脂質分解酵素の培養上清中からの単離、ホスホリパーゼをコードする遺伝子の取得を目的とした。

本論文では、第2章においては *Moritella* sp. HFHI0014 株の有するホスホリパーゼの諸性状の解明について示す。諸性状として卵黄 PC との反応における反応生成物の経時変化および熱安定性、基質特異性、天然由来リン脂質の加水分解特性、PLA1 の基質濃度による影響、

各種溶液中における安定性について示す。第3章においては培養上清の各種溶液中における安定性およびホスホリパーゼの中でもリン酸緩衝液中での安定性の高かった PLA1 の精製について示す。精製は硫酸分画とゲルろ過クロマトグラフィーにより行い、SDS アクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) により単離を確認した。第4章では培養上清中 PLA1 と精製した PLA1 の諸性状の比較について示す。第5章では PLA1 をコードする遺伝子の取得に関する実験について示す。

第2章 HFHI0014 株培養上清の諸性状

2-1 序論

Moritella sp. HFHI0014 株培養上清中にリン脂質分解酵素として PLA1、PLC、LPLC、SMaseC が存在する。このリン脂質分解酵素は以前の研究で 10℃ という低温下において活性を示すことが確認されている。また、PLA1 においては 50℃、10 min の加熱で失活し、4℃ にて 72 h 放置に安定であることが確認されている。しかしながら、産業への応用性を検討するためにはさらなる諸性状の解明が必要であると考えた。そこで、本章では HFHI0014 株の諸性状として卵黄 PC との反応における反応生成物の経時変化および熱安定性、基質特異性、天然由来リン脂質の加水分解特性、PLA1 の反応速度、4℃ における安定性、培養上清の分子量分画について示す。

2-2 実験方法

2-2-1 培養上清の調製

HFHI0014 株のグリセロールストックを K28 液体培地 10 ml (1.5% 寒天 (Becton Dickinson and Company)、0.5% ペプトン (Becton Dickinson and Company)、0.1% 酵母エキス (Becton Dickinson and Company) 1/2 人工海水 (アクアマリン (八洲薬品 (株))) に植菌し、10℃ で 96 h 振とう培養した。培養液から 2 ml 採取し、K28 液体培地 200 ml に加え、再び 10℃ で 72 h 振とう培養した。培養後、遠心分離 (6,600 rpm、3 min) により培養上清を得た。

2-2-2 培養上清と卵黄 PC との反応における反応生成物の経時変化

培養上清 0.5 ml、卵黄 PC 2.5mg、ジエチルエーテル 0.5 ml をバイアル瓶中で混合し、振とう培養機で 200 rpm、10℃ で作用させた。この反応混合液にそれぞれ一定時間ごとに反応混合液に Folch 溶媒 (クロロホルム：メタノール：水=8:4:3 の下層) 3 ml を加え反応を停止した。これを遠心分離 (3,000 rpm、20 min) し、下層のクロロホルム層を得た。上層にさらに Folch 溶媒 3 ml を加え、攪拌、遠心分離を行い下層を回収した。この操作をもう 1 度繰り返し、下層を合わせた (Folch 法⁷⁸⁾ の変法)。これを窒素気流下にて溶媒を除去し、クロロホルム：メタノール=2:1 を 100 μ l 加え、TLC 用サンプルを調製した。このサンプルを薄層クロマトグラフィー (TLC) にて一次元二重展開 (展開溶媒 1st ヘキサン:ジエチルエーテル=1:4、2nd クロロホルム：メタノール：アンモニア水=65：25：5、プレート シリカゲル 60 (Merk(株))を行い、0.0005% プリムリン溶液を噴霧し、紫外線 (365 nm) 下で発色させ、FA、PC、リゾホスファチジルコリン (LPC)、DG、MG のスポットを標準物質 (FA (オレイン酸、Wako(株))、PC (卵黄 PC (キューピー (株)))、LPC (2-アシルリゾホスファチジルコリン (シグマアルドリッチジャパン (株)) DG (D-1,2-ジオレイン (フナコシ (株)))、

MG (2-モノオレイン (フナコシ (株))) との比較により確認し、この FA、PC、LPC、DG、MG のスポットをそれぞれ鉛筆で囲った。鉛筆で囲ったそれぞれの部分のシリカゲルをスパチュラによりかきとった。これに、内部標準物質としてヘプタンに溶解したトリコサン酸 (シグマアルドリッチジャパン (株)) 1 μ g/ μ l を一定量加え、塩酸メタノール法、すなわち、回収した脂質に 5% 塩酸メタノール (東京化成工業 (株)) 2.0 ml を加えブロックヒータにて 100℃ で 3 h 加熱し、メチルエステル化を行った。その後、10 min 静置し、室温まで冷ました。これにヘキサン 2.0 ml を加え攪拌した。遠心分離 (3,000 rpm、15 min) し上層を回収した。このヘキサンによる抽出を 2 回繰り返し、上層をあわせた。ヘキサンを窒素気流下にて脱溶媒を行い、これに脱水メタノール (Wako (株)) 100 μ l を加え、抽出物を溶解し、ガスクロマトグラフィー (GLC) 用試料とし、GLC (GC-1700、検出器 FID、((株) 島津製作所)) により分析した。各反応生成物の濃度は、各脂肪酸のピークのエリアと内部標準のピークのエリアを基準とすることにより、各スポットより得られた FA の mol 数を合計して算出した。そして、算出した全反応生成の濃度中の各反応生成物の濃度の割合を各反応生成物量 (%) として評価した。各反応生成物物の算出法を以下の式に示した。また、GLC 分析条件および GLC 昇温プログラムは表 2-1 および表 2-2 に示した。

$$\begin{aligned} \text{PC}(\%) &= \frac{\text{PC}(\text{nmol}) \times 2}{\text{FA}(\text{nmol}) + \text{PC}(\text{nmol}) \times 2 + \text{LPC}(\text{nmol}) + \text{MG}(\text{nmol}) + \text{DG}(\text{nmol}) \times 2} \times 100 \\ \text{FA}(\%) &= \frac{\text{FA}(\text{nmol})}{\text{FA}(\text{nmol}) + \text{PC}(\text{nmol}) \times 2 + \text{LPC}(\text{nmol}) + \text{MG}(\text{nmol}) + \text{DG}(\text{nmol}) \times 2} \times 100 \\ \text{LPC}(\%) &= \frac{\text{LPC}(\text{nmol})}{\text{FA}(\text{nmol}) + \text{PC}(\text{nmol}) \times 2 + \text{LPC}(\text{nmol}) + \text{MG}(\text{nmol}) + \text{DG}(\text{nmol}) \times 2} \times 100 \\ \text{MG}(\%) &= \frac{\text{MG}(\text{nmol})}{\text{FA}(\text{nmol}) + \text{PC}(\text{nmol}) \times 2 + \text{LPC}(\text{nmol}) + \text{MG}(\text{nmol}) + \text{DG}(\text{nmol}) \times 2} \times 100 \\ \text{DG}(\%) &= \frac{\text{DG}(\text{nmol}) \times 2}{\text{FA}(\text{nmol}) + \text{PC}(\text{nmol}) \times 2 + \text{LPC}(\text{nmol}) + \text{MG}(\text{nmol}) + \text{DG}(\text{nmol}) \times 2} \times 100 \end{aligned}$$

表 2-1 GLC 分析条件

使用カラム	VARIAN WCOT FUSED SILICA (0.25 mm i.d.×25 m)
注入口温度	250℃
検出器温度	250℃
カラム温度	172℃
流圧	30 kPa
メイクアップガス圧	75 kPa
水素圧	50 kPa
空気圧	50 kPa

表 2-2 GLC 昇温プログラム

温度	時間あたりの昇温速度
172℃	1 min
72 - 196℃	4℃/min
196℃	1 min
196 - 200℃	4℃/min
200℃	1 min
200 - 232℃	3℃/min
232℃	3 min
232 - 242℃	5℃/min
242℃	8 min

2-2-3 基質特異性

基質として、天然に存在するグリセロリン脂質である PC、ホスファチジルエタノールアミン(PE)、ホスファチジリンイノシトール (PI)、ホスファチジルグリセロール (PG)、PS、PA を用いた (基質は全てシグマアルドリッチジャパン (株)、純度 98.0%以上)。それぞれの極性基構造を表 4・1 に示した。各基質 2.5 mg と培養上清 0.5 ml、ジエチルエーテル 0.5 ml をバイアル瓶中で混合し、10 h 振とう培養機で 200 rpm、10℃で作用させた。各反応生成物の濃度を算出し、評価(算出方法は 2-2-2 に記載)した。ここで用いた基質は PC は卵黄及び大豆由来、PE は大豆由来、PG は卵黄由来、PS は大豆由来、PI は大豆由来のものを使用した。

表 2-3 リン脂質ごとの極性基構造

リン脂質クラス	極性基構造
ホスファチジルコリン(PC)	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$
ホスファチジルエタノールアミン(PE)	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$
ホスファチジルグリセロール(PG)	$-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$
ホスファチジルセリン(PS)	$-\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$
ホスファチジリンイノシトール(PI)	$-\text{C}_6\text{H}_5(\text{OH})_5$

2-2-4 天然由来リン脂質の加水分解特性

基質として卵黄由来レシチン (Wako (株))、大豆由来レシチン (Wako (株))、イカ由来レシチン (日本化学飼料 (株)) を用いた。それぞれのリン脂質組成を表 2-4 に示した。各基質 2.5 mg と培養上清 0.5 ml、ジエチルエーテル 0.5 ml をバイアル瓶中で混合し、200 rpm、10℃ で作用させた。この反応混合液にそれぞれ一定時間ごとに反応混合液に Folch 溶媒 3 ml を加え反応を停止した。各反応生成物の濃度を算出し、評価(算出方法は 2-2-2 に記載)した。なお、本実験では各リゾリン脂質の分離が困難であったため、リゾリン脂質では LPC のみを評価した。

表 2-4 各原料由来リン脂質の一般的な組成

(%)			
リン脂質	卵黄	大豆	イカ
PC	70	31~34	66
PE	15	22~26	12
PS	0	6~7	3
PI	1	20~23	5
ホスファチジン酸	0	3	0
LPC	5~6	2~3	11
LPE	2~3	2~3	0
SM	2~3	0	3

『化粧品原料と製造技術 ⁷⁹⁾』『イカの栄養・機能成分 ⁸⁰⁾』参照

2-2-5 培養上清中 PLA1 の反応速度

培養上清 0.5 ml を卵黄 PC 0.5、1.0、2.5、5.0、12.5 mg、ジエチルエーテル 0.5 ml バイアル瓶中で混合し、200 rpm、10℃で 30 min 反応させた。各反応生成物の濃度を算出(算出方法は 2-2-2 に記載)した。加水分解率は各脂肪酸のピークのエリアと内部標準のピークのエリアを基準とすることにより、各スポットより得られた FA の mol 数の合計を算出し、以下の式に代入することにより求めた。

なお、以下の式により求められた、加水分解率は sn-1 位及び sn-2 位の FA を完全に加水分解した際の値を 100 %として表している。このため、加水分解率 50 %で PLA1 活性としては 100 %であると評価する。

また、算出した加水分解率および基質濃度より Lineweaver-Burk プロットをとり、Michaelis 定数 K_m と最大反応速度 V_{max} を算出した。

$$\text{加水分解率 (\%)} = \frac{\text{FA (mol)}}{\text{LPC (mol)} + \text{FA (mol)} + \text{PC (mol)} \times 2} \times 100$$

さらに、以下の Henri-Michaelis-Menten⁸¹⁾の式から導かれた数式 1、2、3 に、求めた培養上清中 PLA1 の K_m および V_{max} を代入し、PLA1 の作用による卵黄 PC の減少濃度の理論値を求めた。そして、2-2-2 で測定した反応開始後 40 分後までの PC の減少濃度の経時変化の図と比較した。

以下の式の v は反応速度 (mol/s)、 $[S]$ は基質濃度 (mol)、 t は時間 (s)、 $[S]_0$ は反応前の基質濃度 (mol)、 k は酵素反応の全過程についての一次速度定数である。まず、数式 1 および 2 および 3 により k を求める。そして、数式 3 に k を代入し、反応開始後 40 分後までの PC の減少濃度の理論値を求めた。

$$v = \frac{V_{max}}{K_m} [S] \quad \dots \text{数式 1}$$

$$v = k [S] \quad \dots \text{数式 2}$$

$$\frac{-d[S]/[S]}{dt} = k \quad \dots \text{数式 3}$$

$$[S] = [S]_0 e^{-kt} \quad \dots \text{数式 4}$$

2-2-6 熱安定性

培養上清をヒートブロックで 30℃、40℃、50℃、60℃、70℃でそれぞれ 10 分間保持し、直ちに氷冷した。その後、これらの培養上清 1.0 ml と卵黄 PC 5.0 mg、ジエチルエーテル 1.0 ml をバイアル瓶中で混合し、6 h 振とう培養機で 200 rpm、10℃で作用させた。各反応生成物の濃度を算出(算出方法は 2-2-2 に記載)し、評価した。

2-2-7 4℃における安定性

培養上清を滅菌したメンブランフィルター (ADVANTEC (株)、ポアサイズ 0.20 μm) でろ過滅菌した後、1 ml ずつ分注し 4℃の冷蔵庫に放置した。そして、0、1、3、4、7 day ごとに冷蔵庫から培養上清をとりだし、培養上清 0.5 ml、卵黄 PC 2.5 mg、ジエチルエーテル 0.5 ml をバイアル瓶中で混合し、6 h 振とう培養機で 240 rpm、10℃で反応させた。各反応生成物の濃度を算出(算出方法は 2-2-2 に記載)し、評価した。

2-2-8 培養上清の分子量分画

培養上清 0.5 ml を分子量分画チューブ (ULTRAFREE-0.5、分画サイズ 50,000、100,000 M.W. (Millipore Corporation)) に分注し、遠心分離 (12,000 rpm、4 min) した。遠心後、分子量分画フィルターを通過した画分を回収し、フィルターを通過しなかった画分には 1/2 人工海水 0.5 ml を加え超音波処理した後に回収した。それぞれの画分 0.25 ml に 1/2 人工海水 0.25 ml 加えて 0.5 ml とし、これをジエチルエーテル 0.5 ml、卵黄 PC 2.5 mg とともにバイアル瓶中で混合し、6 h 振とう培養機で 200 rpm、10℃で反応させた。各反応生成物を Folch 法により抽出し、TLC により FA、LPC、MG、DG の有無を確認した (条件は 2-2-2 に記載)。

2-3 結果・考察

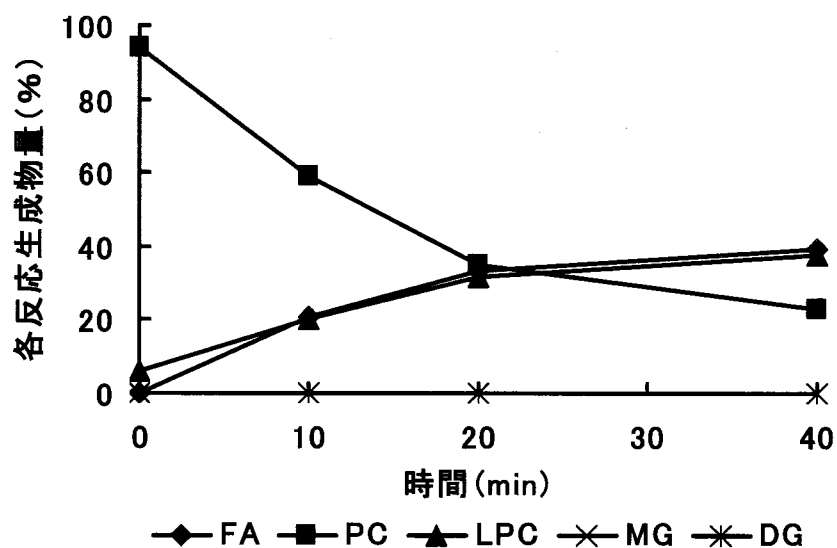
2-3-1 培養上清と卵黄 PC との反応における反応生成物の経時変化

10℃での HFHI0014 株培養上清と卵黄 PC との反応開始 40 min 後までの反応生成物組成を図 2-1(a)に、反応開始 24 h 後までの反応生成物組成を図 2-1 (b) に示した。

図 2-1 (a) のように反応 40 min 後まででは PLA1 の作用により PC からおよび LPC のみが生成し、PLC や LPLC による MG および DG の生産は見られなかった。これより、HFHI0014 株培養上清と卵黄 PC の反応初期では PLA1 が優先的に作用することがわかった。

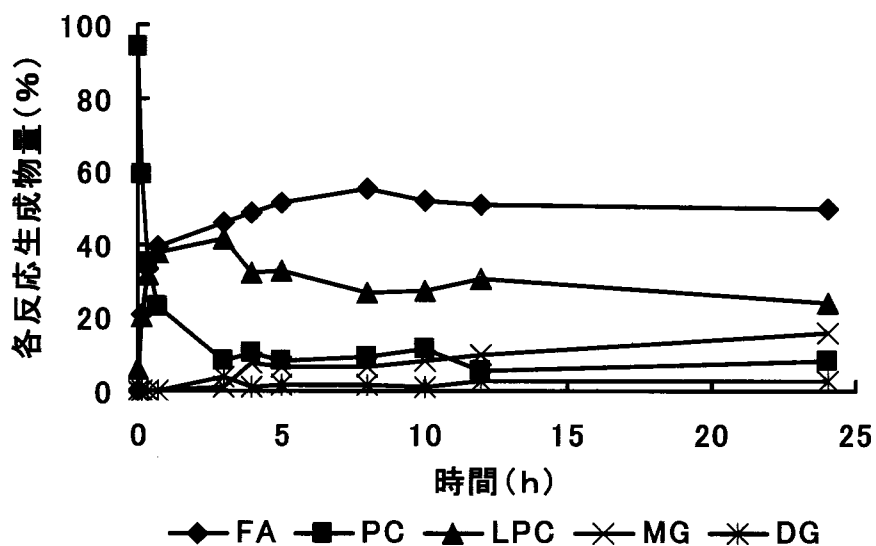
図 2-1 (b) に示した反応開始 24 h 後までの図のように、反応開始 3 h 後から LPLC の作用により LPC から MG が生成され、反応が進むにつれて LPC が減少し MG が増加した。また、反応開始 3 h 後から PLC の作用により DG が生成された。しかしながら、DG の生成量は PLA1 による FA の生成量に比べて顕著に低く、PLC 活性は PLA1 活性に比べて弱いと考えられる。また、PLA1 による FA の生成は 3 h 後がピークとなり、その後 FA はほぼ一定であった。これより、卵黄 PC 2.5 mg との反応では PLA1 活性の反応速度は 3 h 以降では一定になることが示唆された。

図 2-1 より考えられる HFHI0014 株培養上清と卵黄 PC の加水分解経路を図 2-2 に示した。図 2-2 のように、PLA1 が優先的に作用し、PC から LPC が生成され、その LPC が LPLC の作用により MG に変化していくことが確認された。このため、食品用乳化剤などに利用されるリゾリン脂質を効率的に生産するためには LPLC によるリゾリン脂質の分解を抑制する必要があると考えられる。また、PLC により少量ではあるが PC より DG が生成される。PLC は精油工程における脱ガムなどに利用が期待されるが、本培養上清を脱ガムに応用する際には PLA1 による脂肪酸の生産を抑制する必要があると考えられる。



反応温度, 10℃; ジエチルエーテル, 0.5 ml; 卵黄 PC, 2.5 mg; 培養上清, 0.5 ml;
振とう, 200 rpm

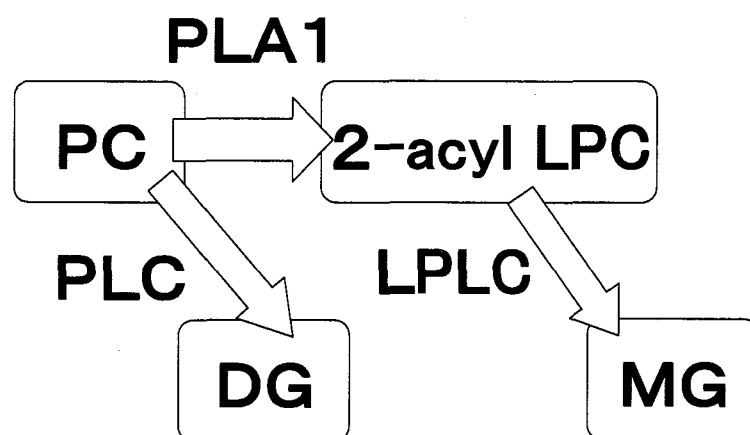
(a) 各反応生成物量の経時変化 (反応初期 40 min 後まで)



条件は (a) と同じ

(b) 各反応生成物量の経時変化 (24 h 後まで)

図 2-1 HFHI0014 株培養上清と卵黄 PC との各反応生成物量の経時変化



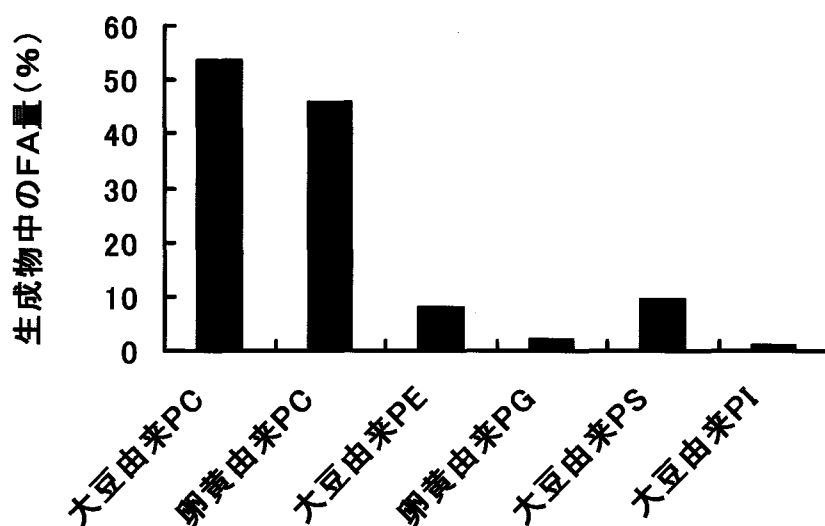
※ この図での矢印は各ホスホリパーゼの作用によって基質から生成物が産生される様子を
示している。

図 2-2 HFHI0014 株培養上清による PC の加水分解経路

2-3-2 基質特異性

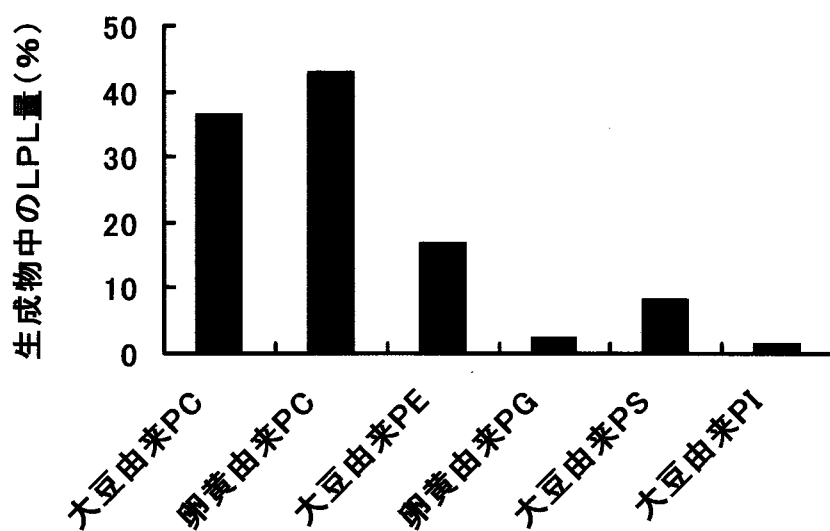
図 2-3 および図 2-4 に示したように、FA とリゾリン脂質 (LPL) の生成量は大豆および卵由来の PC を基質とした場合が最も多く、その他の基質 PE、PG、PS、PI では生成量に多少の違いはあるが、PC を基質とした場合と比較して FA と LPL の生成量は顕著に低かった。これより、PLA1 は PC に対して特異性が強いことがわかった。一般に、我々が食品として摂取しているリン脂質の多くは PC であり、本 PLA1 は PC を効率的に加水分解することから、食品加工への応用が期待できる。

また、図 2-5 および図 2-6 に示したように、LPL から LPLC によって生成される MG の生成量は、PC を基質とした場合には検出されたが、その他の基質では LPL の生成量が少なかったため MG の生成は確認できなかった。PLC によって生成される DG は、PS を基質とした場合には生成されず、PI、PE を基質とした場合の生成量は PC、PG に比べて多かった。しかしながら、PLC 活性は PLA1 活性ほど基質ごとに顕著な差はみられなかった。この結果より、PLC は活性は低いものの多種のリン脂質を除去することができ、精油工程における多種のリン脂質の除去に応用が期待できる。



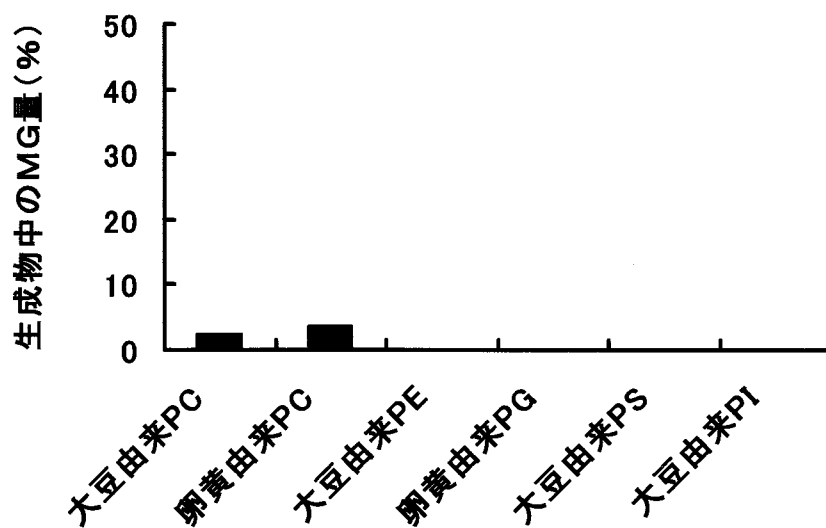
反応温度, 10℃; ジエチルエーテル, 0.5 ml; リン脂質, 2.5 mg; 培養上清, 0.5 ml;
振とう, 200 rpm; 反応時間, 10 h

図 2-3 反応生成物中の FA 量



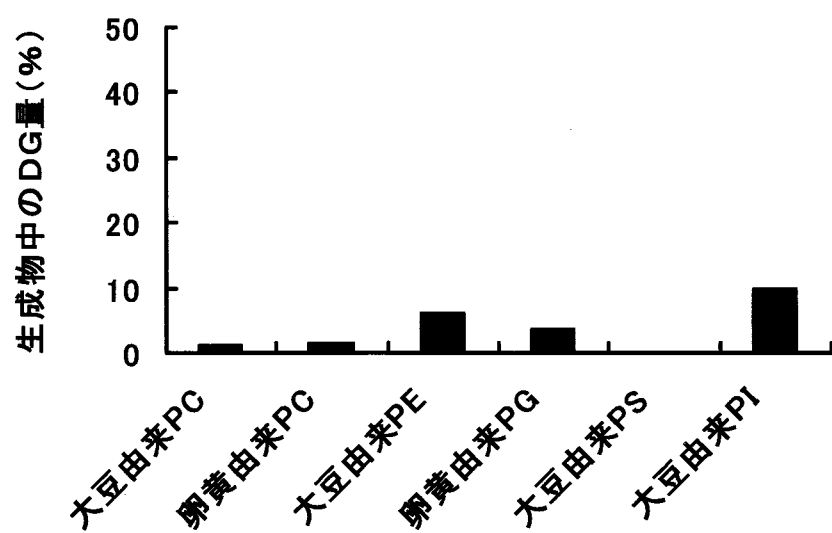
条件は図 2-3 と同じ

図 2-4 反応生成物中の LPL 量



条件は図 2-3 と同じ

図 2-5 反応生成物中の MG 量



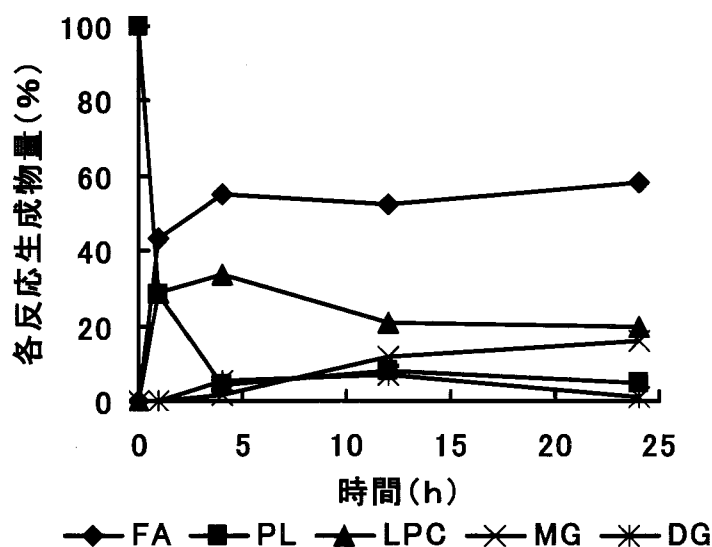
条件は図 2-3 と同じ

図 2-6 反応生成物中の DG 量

2-3-3 天然由来リン脂質の加水分解特性

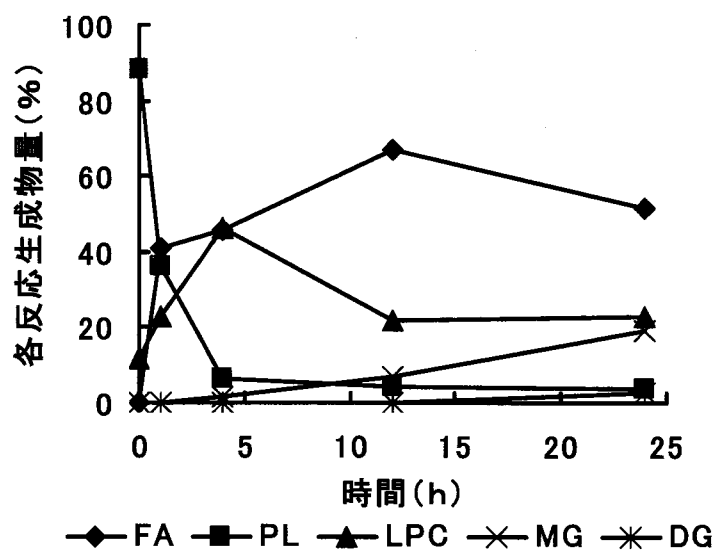
図 2-7、図 2-8、図 2-9 に卵黄および大豆、イカ由来リン脂質の加水分解の結果を示した。図に示すように、卵黄およびイカ由来リン脂質の PL の減少量は大豆由来リン脂質に比べて顕著に多く、卵黄およびイカ由来リン脂質の方が加水分解されていた。PLC による DG の生成量はどのリン脂質も変わらないため、PL の減少量は PLA1 活性の差によるものであると考えられる。本 PLA1 は 2-3-2 に示したように、PC に特異的に作用し、PE や PG、PS、PI にはあまり作用しない。図 2-3 および図 2-4 に示したように、大豆由来リン脂質は卵黄およびイカに比べ PC の割合が低い。以上のことから、本培養上清が大豆由来リン脂質の加水分解量が低いことは、大豆由来リン脂質中に PLA1 によって加水分解される PC 量が少ないためであると考えられる。

HFHI0014 株培養上清によって効率的に加水分解される卵黄由来リン脂質は食品用乳化剤として利用される。1-2 に示したように、リゾリン脂質は通常のリン脂質よりも高い界面活性¹⁸⁾を有することが知られている。このことから、本培養上清中 PLA1 は卵黄から食品用乳化剤として付加価値の高いリゾリン脂質の生産に有用であると考えられる。また、イカリン脂質は様々な生理活性をもつ DHA や EPA を多く含有している。1-3-1 に示したように、天然由来リン脂質の DHA や EPA などの PUFA は sn-2 位に結合していることが多く、PLA1 によって sn-1 位の脂肪酸を加水分解することで、DHA や EPA が濃縮された様々な生理作用をもつリゾリン脂質の生産が期待される。このことから、イカ由来リン脂質を効率的に加水分解する HFHI0014 株培養上清中 PLA1 はイカから新たな生理作用が期待されるリゾリン脂質の生産に有用であると考えられる。



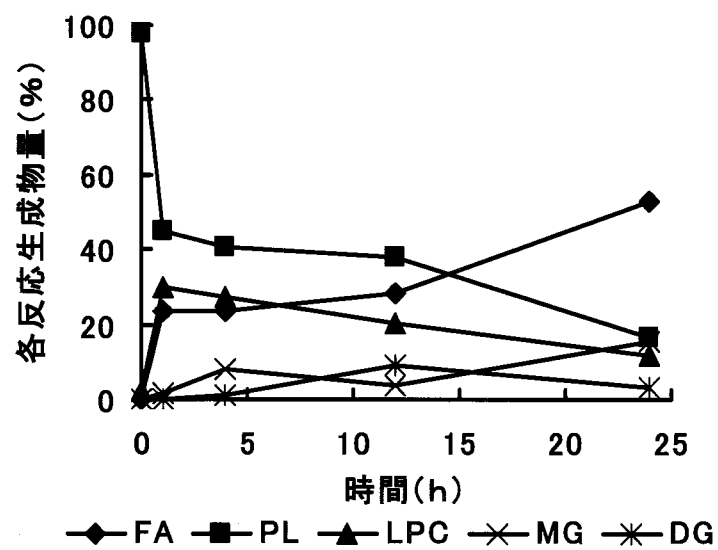
反応温度, 10℃; ジエチルエーテル, 0.5 ml; 卵黄レシチン, 2.5 mg;
培養上清, 0.5 ml; 振とう, 200 rpm

図 2-7 卵黄由来リン脂質の加水分解



条件は図 2-7 と同じ

図 2-8 イカ由来リン脂質の加水分解



条件は図 2-7 と同じ

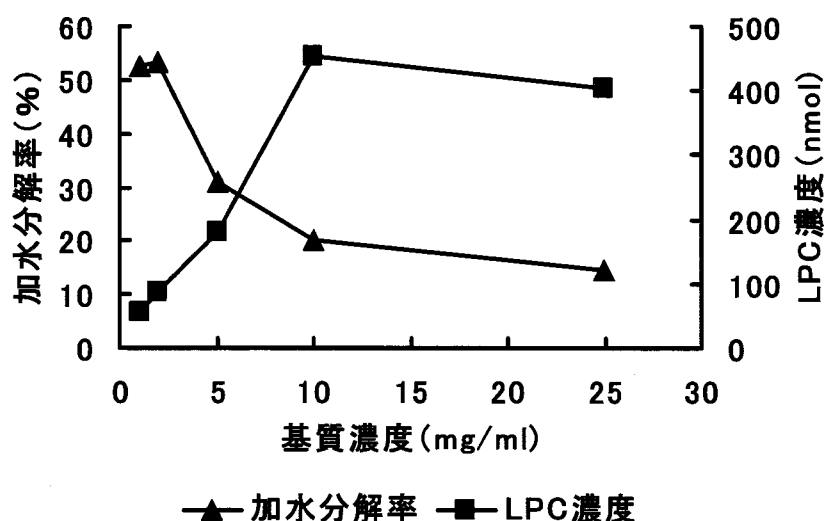
図 2-9 大豆由来リン脂質の加水分解

2-3-4 培養上清中 PLA1 の反応速度

図 2-10 に示したように、加水分解率は卵黄 PC 濃度 1.0、2.0 mg/ml で 50%に達し、その後卵黄 PC 濃度が高くなるにつれて加水分解率は減少した。また、LPC 濃度は卵黄 PC 濃度 10.0 mg/ml でピークに達し、その濃度は約 400 nmol であった。以上のことから、HFHI0014 株培養上清 0.5 ml 中 PLA1 の 30 min の反応における LPC の生成量は約 400 nmol が最大であると考えられる。

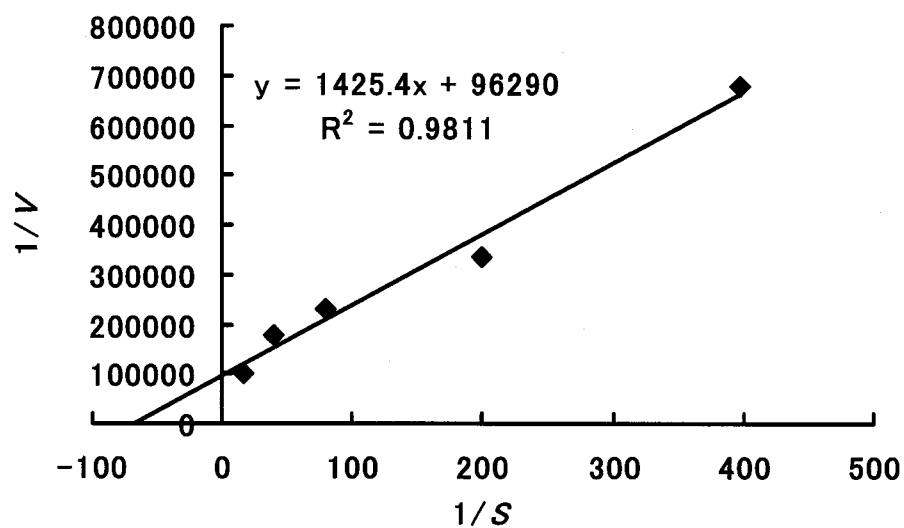
図 2-10 に示した結果をもとに作製した培養上清中 PLA1 と卵黄 PC の反応における Lineweaver-Burk プロットを図 2-11 に示した。Lineweaver-Burk プロットの直線の式は $[1/V] = 28.5[1/S] + 1925.8$ であった。また、Michaelis 定数 K_m は $K_m = 1.5 \times 10^{-2}$ であり、反応の最大速度 V_{max} は $V_{max} = 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/l} \cdot \text{s}$ であった。

図 2-12 に K_m および V_{max} より算出した PLA1 の作用による PC 減少量の理論値と実測値を示した。図 2-12 にあるように、PC 減少量の理論値と実測値はほぼ同じ傾向を示した。この結果より、図 2-1 の HFHI0014 株培養上清と卵黄 PC との各反応生成物量の経時変化の反応開始 40 分後までのグラフは正確に測定できていることが示唆された。



反応温度, 10℃; ジエチルエーテル, 0.5 ml; 卵黄レシチン, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 12.5 mg;
培養上清, 0.5 ml; 振とう, 200 rpm; 反応時間, 30 min

図 2-10 基質濃度ごとの加水分解率および LPC 濃度



条件は図 2-10 と同じ

図 2-11 PLA1 と卵黄 PC の反応における Lineweaver-Burk プロット

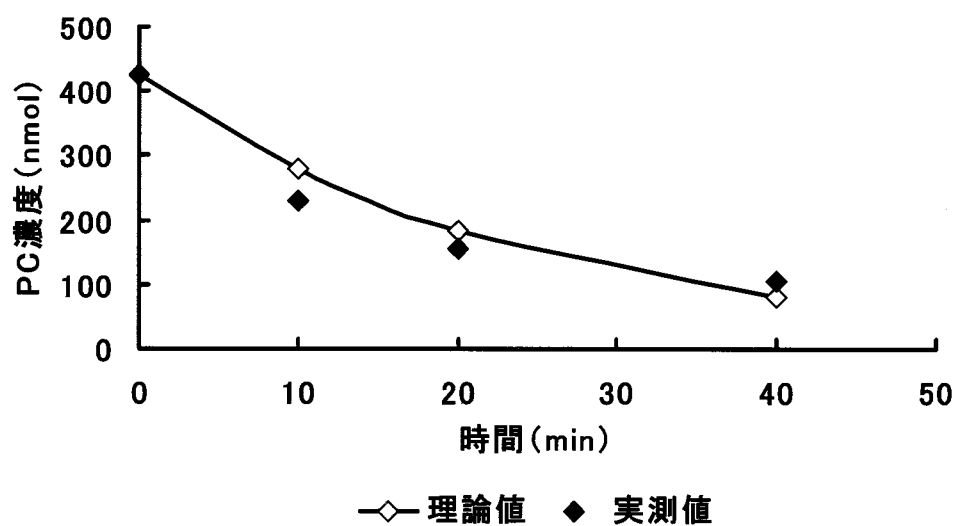
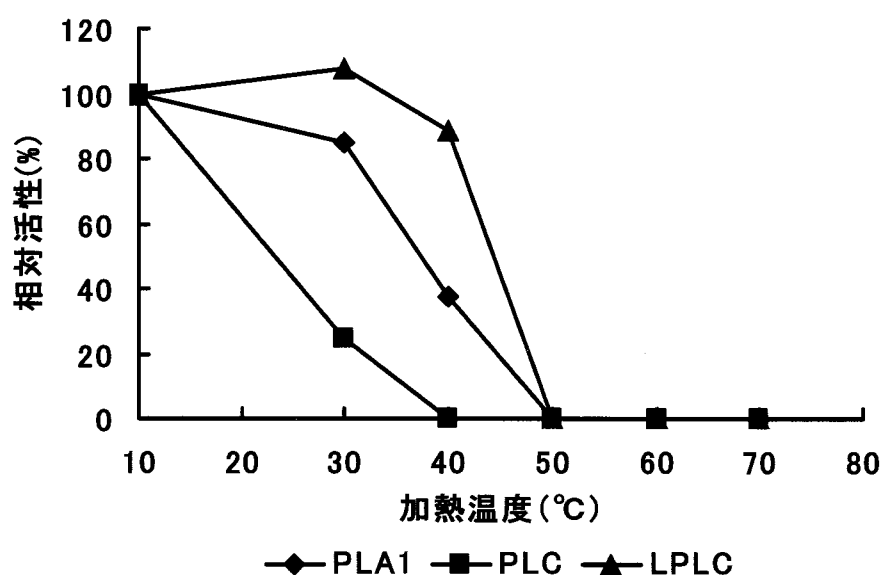


図 2-12 K_m および V_{max} より算出した PC 減少量の理論値と実測値の比較

2-3-5 熱安定性

図 2-13 に示したように、培養上清中の PLA1 活性および LPLC 活性は 50℃、10 min の加熱で失活することが確認された。また、PLC 活性は 40℃、10min の加熱で失活することが確認された。現在産業にて応用されている *Aspergillus* sp.由来 PLA1 や *Fusarium* sp.由来 PLA1 の失活温度は 70℃以上^{70,82)}であり、本リン脂質分解酵素は現在産業に應用されているものに比べ低温で失活するという異なった性状をもつことが確認された。この結果より、比較的低温での失活が可能なることから、脂質の酸化やタンパク質の変性を抑える必要のある食品への応用が期待され、食品加工におけるホスホリパーゼの新たな用途の開発が可能であると考えられる。

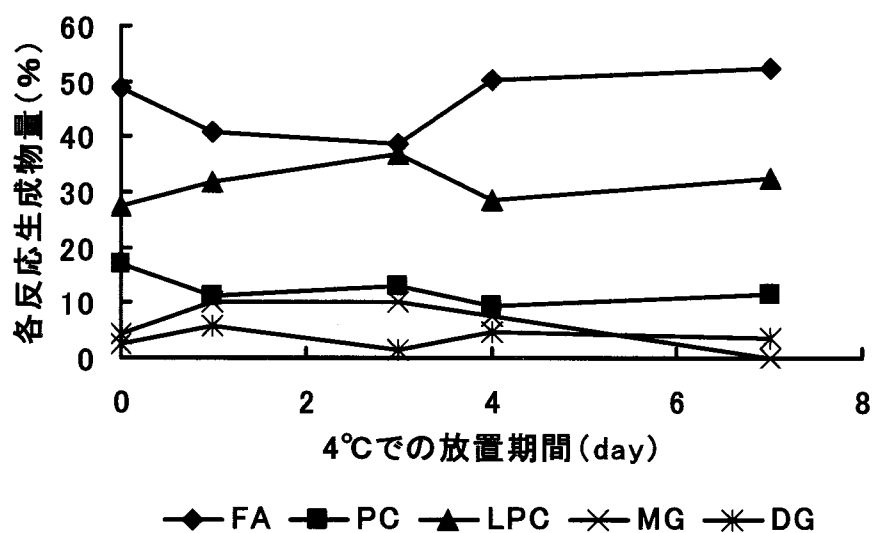


反応温度, 10℃; ジエチルエーテル, 1.0 ml; 卵黄 PC, 5.0 mg; 培養上清, 1.0 ml;
振とう, 200 rpm; 反応時間, 6 h; 加熱時間, 10 min

図 2-13 HFHI0014 株培養上清の熱安定性

2-3-6 4℃における安定性

図 2-14 に示したように、7 日目で MG の生成がみられなくなったことから、LPLC 活性の消失が確認された。また、FA、LPC および MG の生成量に 0 日から 7 日までで大きな差はみられず、PLA1 と PLC の活性は保持されていた。また、LPLC 活性も少なくとも 4 日間は活性が保たれることが確認された。タンパク質の精製は一般的に 4℃で行われることから、本ホスホリパーゼは少なくとも 4 日間の安定性が認められたことから、4℃での精製は可能であることが示唆された。



反応温度, 10℃; ジエチルエーテル, 0.5 ml; 卵黄 PC, 2.5 mg; 培養上清, 0.5 ml;
振とう, 200 rpm; 反応時間, 6 h

図 2-14 各リン脂質分解酵素の 4℃での安定性

2-3-7 培養上清の分子量分画

表 2-5 に示したように培養上清の分子量分画を行った結果、50,000 M.W.以上 100,000 M.W.以下の画分に PLA1 活性が確認され、培養上清中 PLA1 の分子量は 50,000~100,000 であることが示唆された。また、PLC および LPLC 活性は 100,000 M.W.以上に確認され、培養上清中 PLC および LPLC の分子量は 100,000 以上であることが示唆された。この結果より、培養上清中 PLA1 活性と PLC、LPLC 活性は異なる酵素による作用であることが示唆された。

表 2-5 培養上清の分子量分画による各画分のホスホリパーゼ活性

分子量	画分	PLA1	PLC	LPLC
50,000	以上	○	○	○
	以下	×	×	×
100,000	以上	○	○	○
	以下	○	×	×

○…活性あり、×…活性なし

反応温度, 10℃; ジエチルエーテル, 0.5 ml; 卵黄 PC, 2.5 mg; 酵素液, 0.5 ml;
振とう, 200 rpm; 反応時間, 6 h

第3章 培養上清中からのリン脂質分解酵素の精製

3-1 序論

第2章に示したように、本培養上清中 PLA1 および PLC、LPLC は 10℃ という低温下で効率的にリン脂質を改質することができ、50℃ で失活するという現在実用化されているホスホリパーゼには無い有用な性状をもつ。しかしながら、2-3-2 で示したように本培養上清中 PLA1 を用いて食品用乳化剤などに用いられるリゾリン脂質を生産するためには LPLC による分解を抑制する必要がある、PLC を脱ガムに用いる際にも PLA1 の脂肪酸の生成を抑制する必要がある。このように、各種のホスホリパーゼが混合した状態では、様々な用途に応用することは困難であるため、各ホスホリパーゼの単離が必要となる。本章では培養上清からの各リン脂質分解酵素の精製について示す。

これらのホスホリパーゼの精製には、脱塩やゲルろ過クロマトグラフィーなどの工程を必要とする。そこで、精製に先立ち、本ホスホリパーゼの各種溶液中における安定性を、透析膜を用いて評価した。リン酸緩衝液中での安定性が確認された PLA1 の精製を行った。精製は硫安分画とゲルろ過クロマトグラフィーにより進め、SDS-PAGE により精製の確認を行った。さらに、精製した PLA1 より N 末端アミノ酸配列を決定した。

3-2 実験方法

3-2-1 各種溶液中における安定性

透析に用いる各種外液として、0.02 M リン酸緩衝液 (pH7.0) と蒸留水、K28 培地を用いた。ここで使用した 0.02 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) は 0.2 M リン酸水素二ナトリウム溶液に 0.2 M リン酸二水素ナトリウム溶液を加えて pH 7.0 に調製した後、蒸留水で 10 倍に希釈したものである⁸³⁾。また、透析膜として使用するセルロース膜 (透過分子量 14000、三光純薬 (株)) は沸騰した蒸留水中で 2 min 煮沸し、蒸留水で数回洗浄した。セルロース膜の下部を強く縛り、HFHI0014 株培養上清 1 ml を分注し、セルロース膜の上部を木棒に縛り付け、各種外液 200 ml 中でマグネットスターラーにより攪拌しながら 4℃ で透析した。2 h 後、外液を新しい溶液に交換し、再び 4℃ で一晚透析した。透析後、セルロース膜から酵素液を回収し、これらの培養上清 0.5 ml と卵黄 PC 2.5 mg、ジエチルエーテル 0.5 ml をバイアル瓶中で混合し、6 h 振とう培養機で 200 rpm、10℃ で作用させた。各反応生成物の濃度を算出 (算出方法は 2-2-2 に記載) した。そして、PLA1 では 1 min に 1 μ mol の脂肪酸を産生する活性量、PLC では 1 min に 1 μ mol の DG を産生する活性量、LPLC では 1 min に 1 μ mol の MG を産生する活性量を各々 1 U として定義し、評価した。

3-2-2 培養上清の硫安分画

HFHI0014 株培養上清を硫酸アンモニウム（硫安）を用いて 0~30%飽和画分、30~50%飽和画分、50~80%画分に分画し、粗酵素液を濃縮した。硫安分画は全て 4℃下で操作した。HFHI0014 株培養上清 300 ml に 30 %飽和となるように硫安 52.8 g を少しずつ加え、攪拌しながら 1 h 放置した。溶液を遠心分離（3,500 rpm、20 min）し、沈殿を採取し、0.02 M リン酸緩衝液（pH 7.0）4 ml に溶解し、0~30 %飽和画分とした。上層溶液に 50 %飽和画分となるように 38.1 g を少しずつ加え、0~30 %飽和画分と同様の操作で沈殿を採取し、0.02 M リン酸緩衝液（pH 7.0）4 ml に溶解し、30~50 %飽和画分とした。上層溶液に 80 %飽和画分となるように 64.2 g を少しずつ加え、0~30 %飽和画分と同様の操作で沈殿を採取し、0.02 M リン酸緩衝液（pH 7.0）4 ml に溶解し、50~80%飽和画分とした。採取した画分を 500 ml のリン酸緩衝液中で 3-2-2 と同様の操作で透析した。透析後、各画分溶液および培養上清 0.5 ml 卵黄 PC 12.5 mg、ジエチルエーテル 0.5 ml をバイアル瓶中で混合し、30 min 振とう培養機で 200 rpm、10℃で作用させた。各反応生成物の濃度を算出(算出方法は 2-2-2 に記載)した。そして、1 min に 1 μ mol の脂肪酸を産生する PLA1 の活性量を 1 U と定義し、評価した。

3-2-3 ゲルろ過クロマトグラフィーによる精製

硫安分画において PLA1 活性が確認された 30~80 %飽和画分をゲルろ過クロマトグラフィーにより精製した。HFHI0014 株培養上清 900 ml を 3-2-2 と同様の方法で硫安分画を行い、0.02 M リン酸緩衝液（pH 7.0）に溶解した 30~80 %飽和画分 12 ml を採取した。

Bio-Gel P-100 gel medium（BIO RAD 社）41.67 g を溶離液 1 l（0.02 M リン酸緩衝液（pH 7.0）、0.2 M NaCl）にて膨潤させ、Econo-Column Chromatography Column（2.5×100cm、BIO RAD 社）に充填した。このカラムにゲル容積の約 3 倍量の 1500 ml の溶離液を流速約 25 ml/h にて流し、カラム内を平衡化した。平衡化後、採取した 30~80 %飽和画分 12 ml をカラムに流し入れ、直ちに溶離液を流速約 25 ml/h にて流し、試料を溶出させた。1 フラクションは 5 ml の容量になるように設定した。約 1 l の溶離液を流した後、各フラクションを回収した。各フラクション 0.5 ml、と卵黄 PC 2.5 mg、ジエチルエーテル 0.5 ml をバイアル瓶中で混合し、6 h 振とう培養機で 200 rpm、10℃で作用させた。各反応生成物を Folch 法により抽出し、TLC により FA の有無を確認し、PLA1 活性画分を確認した（条件は 2-2-2 に記載）。ここで得られた PLA1 活性画分を凍結乾燥処理した後 9 ml の 0.02 M リン酸緩衝液（pH 7.0）溶解し、透析した。この試料溶液を前述と同様の方法でゲルろ過クロマトグラフィーにより分画した。2 回目のゲルろ過クロマトグラフィーにより得た各フラクション 0.5 ml と卵黄 PC 2.5 mg、ジエチルエーテル 0.5 ml をバイアル瓶中で混合し、6 h 振とう培養機で 200 rpm、10℃で作用させた。各反応生成物の濃度を算出(算出方法は 2-2-2 に記載)した。そして、1 min に 1 μ mol の脂肪酸を産生する PLA1 の活性量を 1 U と定義し、評価した。また、各フラクションのタンパク質量を Bradford 法により算出した。

3-2-4 SDS-PAGE による分析

3-2-3 において 2 回のゲルろ過クロマトグラフィーにより得た PLA1 活性が確認された各フラクション 25 μ l に SDS-PAGE サンプル処理溶液 (0.125 M Tris-HCl buffer (pH 6.8)、10% 2-メルカプトエタノール、0.4% SDS、10% スクロース、0.01% ブロムフェノールブルー (BPB)) 25 μ l を混合し、ウォーターバスにて 100°C で 2 min 処理した。処理した溶液 5 μ l および標準タンパク溶液 (分子量マーカー 高分子量 (Wako (株)) 5 μ l を 12.5%ゲルに添加し、SDS-PAGE 泳動溶液 (25 mM Tris、192 mM グリシン、0.1% SDS) によりコンパクト PAGE・ツイン電気泳動装置 (アトー (株)) により泳動した。泳動後、脱色液 (30% メタノール、10% 酢酸) によりバンドを固定した。クマシーブリリアントブルー (CBB) 染色液 (30% メタノール、10% 酢酸、0.1% CBB R-250) により染色した後、脱色液により脱色し各バンドを確認した。

3-2-5 N 末端アミノ酸配列分析および相同性検索

3-2-4 の PLA1 活性画分の SDS-PAGE 分析において単一のバンドが確認された試料をエレクトロブロットティングし、アミノ酸シーケンサーにより PLA1 の N 末端アミノ酸配列を分析した。

単一のバンドが確認された精製 PLA1 溶液を 7.5~20% のグラジエント ポリアクリルアミドゲルを用いて Laemmli らの方法⁸⁴⁾に従って電気泳動を行った後、ゲルをトランスファー溶液 (10 mM 3-シクロヘキシルアミノ - 1 - プロパンスルホン酸, 10% メタノール, pH 11.0) に浸し、トリスおよびグリシン量を減少させた。このゲルをトランスファー溶液を用いてブロットティングし、ポリビニリジン ジフルオリド (PVDF) 膜に PLA1 活性画分の単一のバンドを転写させた。この PVDF 膜を CBB 染色し、単一のバンドを切り取り、アミノ酸シーケンサー (ABI Procise 492HT Protein Sequencer (アプライドバイオシステムズジャパン (株))) を用いて N 末端アミノ酸配列を分析した⁸⁵⁾。また、分析した N 末端アミノ酸配列は BLAST を用いて相同性検索を行った。

3-3 結果・考察

3-3-1 各種溶液中における安定性

表 3-1 に示したように、PLA1 では透析における外液としてリン酸緩衝液および K28 培地を用いた際に活性が保持し、蒸留水を用いた際には失活することが確認された。また、PLC および LPLC では透析における外液として K28 培地を用いた際にのみ活性が保持し、リン酸緩衝液および K28 培地を用いた際には失活することが確認された。培養上清中の全てのホスホリパーゼ活性 (PLA1、PLC、LPLC) が保持するのは K28 培地のみであった。しかしながら、K28 培地の成分であるバクトペプトンと酵母エキスにはタンパク質が数種類含まれており、タンパク質の精製に適していない。そこで、タンパク質に適しているリン酸緩衝液を外液に用いても活性が残存する PLA1 のみの精製を進めることにした。

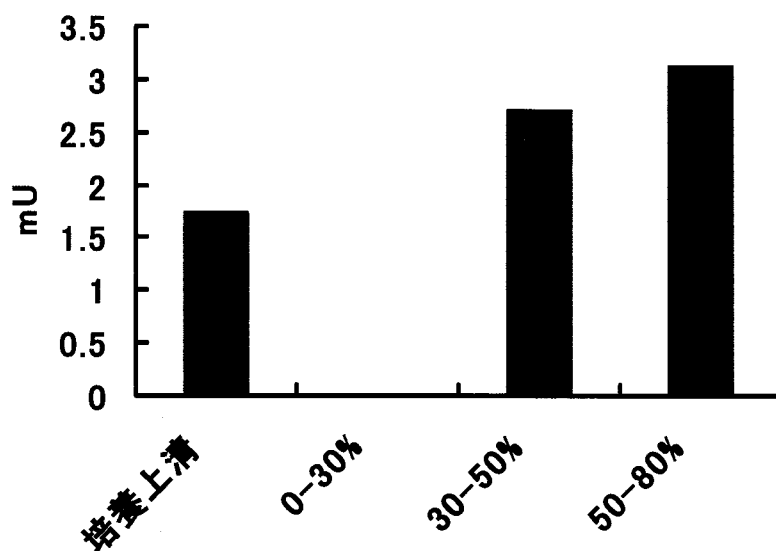
表 3-1 各種溶液中におけるホスホリパーゼの安定性試験結果

(mU)				
外液	透析なし	リン酸緩衝液	K28 培地	蒸留水
PLA1	0.88	0.65	0.89	N.D.
PLC	0.05	N.D.	0.01	N.D.
LPLC	0.12	N.D.	0.17	N.D.

反応温度, 10℃; ジエチルエーテル, 0.5 ml; 卵黄 PC, 2.5 mg; 培養上清, 0.5 ml;
振とう, 200 rpm; 反応時間, 6 h

3-3-2 培養上清の硫安分画

図 3-1 に示したように、30~50%飽和画分および 50~80%飽和画分に PLA1 活性が確認された。この PLA1 活性が確認された 30~80%飽和画分を採取して、0.02 M リン酸緩衝液 (pH7.0) に溶解し、一晚透析した後に、ゲルろ過クロマトグラフィーにより精製を進めた。

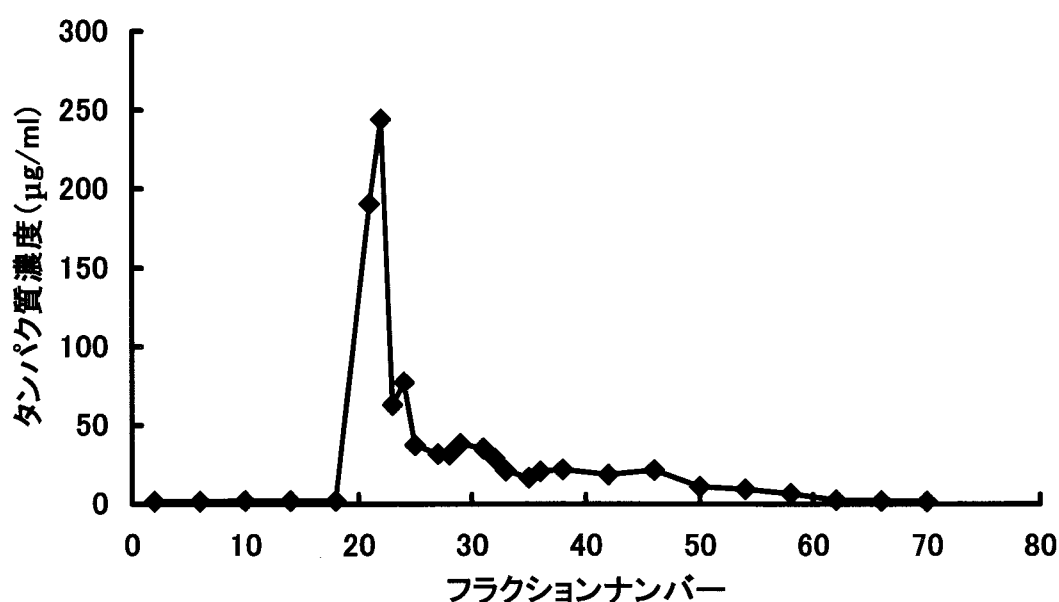


反応温度, 10℃; ジエチルエーテル, 0.5 ml; 卵黄 PC, 12.5 mg;
酵素液, 0.5 ml; 振とう, 200 rpm; 反応時間, 30 min

図 3-1 培養上清および硫安分画により得られた画分の PLA1 活性

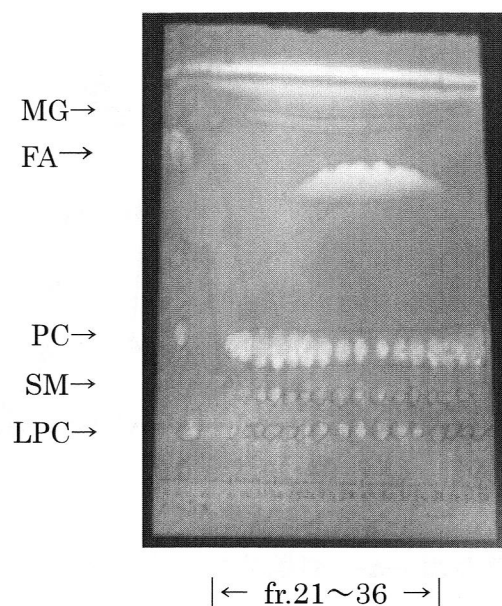
3-3-3 ゲルろ過クロマトグラフィーによる精製

1 回目のゲルろ過クロマトグラフィーによるタンパク質の溶出の結果を図 3-2 に示した。また、この分画で採取したフラクションの PLA1 活性の検出を行った結果、図 3-3 に示したように、fr.25~34 に PLA1 活性が検出された。この fr.25~34 を凍結乾燥により濃縮した後に再度ゲルろ過クロマトグラフィーにより精製を進めた。その溶出結果および各フラクションの PLA1 活性の比活性を図 3-4 に示した。図 3-4 のように fr.25 から fr.35 に PLA1 活性が検出された。これより、fr.25 から fr.35 を SDS-PAGE により分析した。



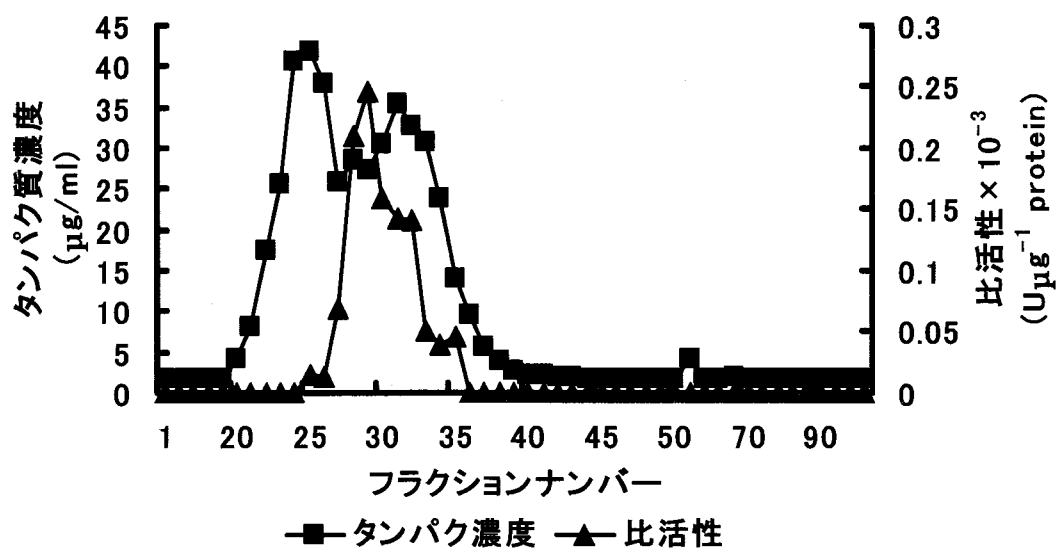
ゲル, Bio-Gell P-100 gel medium; 温度, 4℃; 流速, 25 ml/h

図 3-2 ゲルろ過クロマトグラフィー (1 回目) による溶出



反応温度, 10℃; ジエチルエーテル, 0.5 ml; 卵黄 PC, 2.5 mg;
 培養上清, 0.5 ml; 振とう, 200 rpm; 反応時間, 6 h

図 3-3 ゲルろ過クロマトグラフィー (1 回目) による
 PLA1 活性画分の TLC 結果



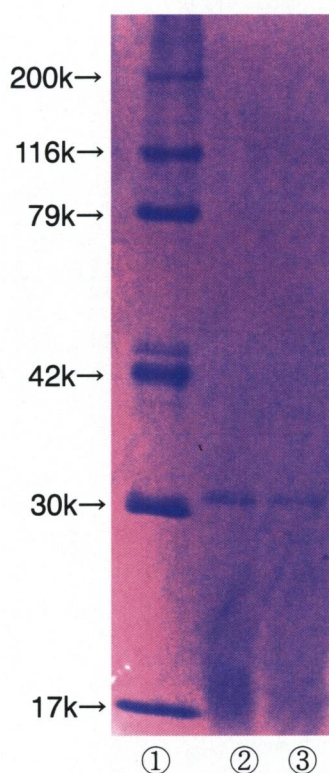
ゲル, Bio-Gell P-100 gel medium; 温度, 4℃; 流速, 25 ml/h;
 反応温度, 10℃; ジエチルエーテル, 0.5 ml; 卵黄 PC, 2.5 mg;
 培養上清, 0.5 ml; 振とう, 200 rpm; 反応時間, 6 h

図 3-4 ゲルろ過クロマトグラフィー (2 回目) による溶出

3-3-4 PLA1 活性画分の SDS-PAGE による分析結果

3-3-3 に示した 2 回目のゲルろ過クロマトグラフィーで採取した PLA1 活性画分 fr.25 から fr.35 を SDS-PAGE により分析した結果を、図 3-5 に示した。図 3-5 に示したように、fr.33 および fr.34 において分子量約 30,000 の位置に単一のバンドが確認され、このバンドが PLA1 であると示唆された。また、この結果より本 PLA1 の分子量は約 30,000 であると推定された。

2-3-7 に示したように、分子量分画フィルターによって分子量の推定を行ったところ HFHI0014 株培養上清中 PLA1 は 50,000~100,000 であると推定され、SDS-PAGE の分析結果とは異なる結果であった。これより、本 PLA1 は培養上清中では 2 量体もしくは 3 量体を形成していると考えられ、SDS-PAGE により分析する際には SDS-PAGE 処理液を加え、100℃で処理したことで化学結合が切断され、1 量体となり、分子量が 30,000 であると推定されたと考えられる。



- ① 分子量マーカー
- ② fr.33
- ③ fr.34

図 3-5 PLA1 活性画分の SDS-PAGE

3-3-5 精製 PLA1 の N 末端アミノ酸配列分析および相同性検索結果

単一のバンドが確認された fr.33 中の PLA1 の N 末端アミノ酸配列を分析した結果、*Moritella* sp. HFHI0014 の有する PLA1 の N 末端アミノ酸配列は KASEFITIGTGGVTGVYYPA であることが確認された。また、BLAST を用いた本 PLA1 の N 末端アミノ酸配列の相同性検索の結果を表 3-2 に示した。相同性検索の結果、*Moritella* sp. HFHI0014 株の有する PLA1 の N 末端アミノ酸配列と高い相同性を示す既知の PLA1 は確認されなかった。本 PLA1 の N 末端アミノ酸配列と高い相同性を示したタンパク質は多くは細菌由来の TRAP transporter solute receptor, TAXI family protein および immunogenic protein であった。immunogenic protein は免疫原性のタンパク質であり、その働きは PLA1 とは異なる。また、TRAP transporter solute receptor, TAXI family protein はグラム陰性細菌などの細胞膜における物質の輸送に関するタンパク質であり⁸⁶⁾、その働きは immunogenic protein と同様に PLA1 とは異なる。この結果より、本 PLA1 は新規のアミノ酸配列をもつ PLA1 であることが示唆された。

表 3-2 *Moritella* sp. HFHI0014 株の有する PLA1 の N 末端アミノ酸配列
の相同性検索結果

Sequences producing significant alignments	Score (Bits)	E Value
TRAP transporter solute receptor, TAXI family protein [<i>Silicibacter pomeroyi</i> DSS-3]	54.9	5e-07
immunogenic protein [<i>Oceanospirillum</i> sp. MED92]	54.5	7e-07
immunogenic protein [<i>Marinomonas</i> sp. MED121]	54.5	7e-07
immunogenic protein [<i>Stappia aggregata</i> IAM 12614]	54.1	9e-07
TRAP transporter solute receptor, TAXI family protein [<i>Rhodobacterales</i> bacterium HTCC2654]	54.1	9e-07
immunogenic protein [Marinobacter sp. ELB17]	53.2	2e-06
TRAP transporter solute receptor, TAXI family protein [<i>Stappia aggregata</i> IAM 12614]	52.0	4e-06
putative immunogenic protein [<i>Photobacterium profundum</i> 3TCK]	52.0	4e-06
putative immunogenic protein [<i>Photobacterium profundum</i> SS9]	52.0	4e-06
TRAP transporter solute receptor, TAXI family protein [<i>Roseovarius nubinhibens</i> ISM]	52.0	4e-06
TRAP transporter solute receptor, TAXI family protein [<i>Silicibacter</i> sp. TM1040]	52.0	4e-06
TRAP transporter solute receptor, TAXI family protein [<i>Roseobacter</i> sp. SK209-2-6]	51.5	5e-06
TRAP transporter solute receptor, TAXI family protein [<i>Roseobacter</i> sp. MED193]	51.5	5e-06
immunogenic protein [<i>Oceanicola batsensis</i> HTCC2597]	51.5	5e-06
immunogenic protein [<i>Vibrio harveyi</i> HY01]	51.1	7e-06
immunogenic protein [<i>Vibrio shilonii</i> AK1]	51.1	7e-06
immunogenic protein [<i>Vibrionales</i> bacterium SWAT-3]	51.1	7e-06
immunogenic protein [<i>Vibrio alginolyticus</i> 12G01]	51.1	7e-06
immunogenic protein [<i>Vibrio fischeri</i> ES114]	51.1	7e-06
immunogenic protein [<i>Vibrio parahaemolyticus</i> RIMD 2210633]	51.1	7e-06
TRAP-type uncharacterized transport system, periplasmic component [<i>Vibrio vulnificus</i> CMCP66]	51.1	7e-06

3-3-6 精製のまとめ

表 3-3 に精製過程の液量やタンパク量、比活性を示した。表 3-3 に示したように、培養上清に比べ精製 PLA1 の比活性は増加しなかった。一般的に、酵素精製ではその他の混在するタンパク質が除去されることで、酵素溶液の総タンパク質中の目的の酵素の割合は上昇するため、酵素活性が維持されていれば比活性は向上する。本実験の精製では表 3-1 にも示したように、リン酸緩衝液による透析により培養上清の PLA1 活性は残存するものの活性は減少していた。これより、リン酸緩衝液のみでは PLA1 活性を安定的に保持することができないため、精製後の比活性が増加しなかったと考えられる。そのため、本 PLA1 活性を安定的に保持することのできる精製条件を検討する必要がある、第 4 章にてリン酸緩衝液中に加える安定剤の検討を行った。

表 3-3 精製のまとめ

	液量 (ml)	総タンパク質量 (mg)	総活性 (mU)	比活性 (mU/mg protein)
培養上清	900	54.2	1.1	240.0
硫酸分画物	12	23.8	8.0	6.4
精製 PLA1	5	0.153	0.4	50.0

第4章 精製 PLA1 の諸性状

4-1 序論

第3章において HFHI0014 株培養上清より硫安分画およびゲルろ過クロマトグラフィーにより PLA1 を精製した。培養上清には PLA1 の他に PLC や LPLC、SMaseC などのリン脂質分解酵素やその他の分泌物、K28 液体培地の諸成分などが含まれており、培養上清中における PLA1 はこのような様々な物質と相互作用を起こしていた可能性が考えられる。そのため、培養上清中 PLA1 と精製した PLA1 の諸性状には何らかの違いがあると考えられる。

また、HFHI0014 株の有する PLA1 を工業的に用いる場合には、その他の混在物が少ない精製したものの方が適しており、現在工業的に使用されている酵素の多くは精製物である。このため、工業的な応用を目指す上で精製した PLA1 の諸性状を知ることは必要であると考えた。

本章では、精製 PLA1 の諸性状として、精製 PLA1 のリン脂質のアシル基への作用位置の確認、熱安定性評価、至適温度評価、培養上清と精製 PLA1 の基質濃度の影響の比較、基質特異性評価、精製 PLA1 と PC との反応に対する PE、PG の影響、精製 PLA1 の金属イオンの影響、さらに PLA1 の精製における安定剤の検討について示す。

4-2 実験方法

4-2-1 精製 PLA1 のリン脂質のアシル基への作用位置の確認

反応の基質として合成 PC を用いた。すなわち、1-パルミトイル(C16:0)-2-オレオイル(C18:1)PC(シグマアルドリッチ(株)) 5.0 mg 及び 1-オレオイル(C18:1)-2-パルミトイル(C16:0)PC(シグマアルドリッチ(株)) 5.0 mg を使用した。

2 種の合成 PC それぞれとジエチルエーテル 0.5 ml、精製 PLA1 0.3 ml を 10℃にて振とう培養機(200 rpm)で 12 h 反応させた。各反応生成物の濃度を算出(算出方法は 2-2-2 に記載)し、1-パルミトイル-2-オレオイル PC に作用させたものではパルミチン酸メチル、1-オレオイル-2-パルミトイル PC に作用させたものではオレイン酸メチルが他方の脂肪酸よりも有意に多く検出されたものを PLA1 活性であると評価した。

精製 PLA1 の精製方法は第3章に記載した条件と同様である。

4-2-2 精製 PLA1 と培養上清の反応速度

本実験では、培養上清と精製 PLA1 の卵黄 PC 2.5 ml を加水分解する際の活性量を同等にするために、培養上清を K28 液体培地により 2 倍に希釈した。培養上清および精製 PLA1 0.3ml を卵黄 PC 0.5、1.0、2.5、5.0 mg、ジエチルエーテル 0.5 ml バイアル瓶中で混合し、200 rpm、10℃で 30 min 反応させた。各反応生成物の濃度を算出し、加水分解率を求めた(算出方法は 2-2-2 および 2-2-5 に記載)。また、算出した加水分解率および基質濃度より Lineweaver-Burk プロットをとり、Michaelis 定数 K_m と最大反応速度 V_{max} を算出した。

4-2-3 精製 PLA1 の基質特異性

基質として、天然に存在するグリセロリン脂質である PC、PE、PI、PG、PS (全てシグマアルドリッチ (株)、純度 98.0%以上) を用いた。それぞれの極性基構造を表 2-3 に示した。各基質 2.5 mg と培養上清および精製 PLA1 0.5 ml、ジエチルエーテル 0.5 ml をバイアル瓶中で混合し、10 h 振とう培養機で 200 rpm、10℃で作用させた。各反応生成物中の遊離脂肪酸の濃度を算出(算出方法は 2-2-2 に記載)し、1 min に 1 μ mol の脂肪酸を産生する PLA1 の活性量を 1 U と定義し、評価した。

ここで用いた基質は PC は卵黄及び大豆由来、PE は大豆由来、PG は卵黄由来、PS は大豆由来、PI は大豆由来のものを使用した。

4-2-4 PLA1 と PC との反応に対する PE、PG の影響

精製 PLA1 との反応率の低いリン脂質の PC との共存下における作用機構の解析のために、培養上清中 PLA1 と各濃度の PC の反応混合液に一定量の PE および PG を加え試験した。

培養上清 0.5 ml を卵黄 PC 0.5、1.0、2.5、5.0、12.5 mg、ジエチルエーテル 0.5 ml、PE または PG 各 0.5 mg をバイアル瓶中で混合し、200 rpm、10℃で 30 min 反応させた。各反応生成物の濃度を算出し、加水分解率を求めた(算出方法は 2-2-2 および 2-2-6 に記載)。また、算出した加水分解率および基質濃度より Lineweaver-Burk プロットをとり、Michaelis 定数 K_m と最大反応速度 V_{max} を算出した。

4-2-5 精製 PLA1 の熱安定性

精製 PLA1 および培養上清をヒートブロックで 10℃、20℃、30℃、40℃、50℃、60℃でそれぞれ 10 min 保持し、直ちに氷冷した。その後、これらの精製 PLA1 および培養上清 1.0 ml と卵黄 PC 5.0 mg、ジエチルエーテル 1.0 ml をバイアル瓶中で混合し、6 時間振とう培養機で 200 rpm、10℃で作用させた。反応生成物中の遊離脂肪酸の濃度を算出(算出方法は 2-2-2 に記載)し、1 min に 1 μ mol の脂肪酸を産生する PLA1 の活性量を 1 U と定義し、評価した。

4-2-6 精製 PLA1 の至適温度

精製 PLA1 および培養上清 0.5 ml と卵黄 PC 2.5 mg、ジエチルエーテル 0.5 ml をバイアル瓶中で混合し、10℃、20℃、30℃、40℃、50℃、一定時間、200 rpm で振とう培養機で作用させた。各温度ごとの反応生成物中の遊離脂肪酸の濃度を算出(算出方法は 2-2-2 に記載)し、1 min に 1 μ mol の脂肪酸を産生する PLA1 の活性量を 1 U と定義し、評価した。

4-2-7 精製 PLA1 の金属イオンの影響

精製 PLA1 に対する金属イオンの影響を調べるために、金属として CaCl₂、MgCl₂、KCl、FeCl₃、NaCl、CoCl₂ の 6 種類を用いた。精製 PLA1 0.4 ml と卵黄 PC 2.5 mg、ジエチルエーテル 0.5 ml、50mM 金属イオン 各 0.1 ml (終濃度 10 mM) をバイアル瓶中で混合し、6 h 振とう培養機で 200 rpm、10℃で作用させた。各反応生成物中の遊離脂肪酸の濃度を算出(算出方法は 2-2-2 に記載)し、1 min に 1 μ mol の脂肪酸を産生する PLA1 の活性量を 1 U と定義し、評価した。

4-2-8 PLA1 活性の安定な精製方法の検討

本PLA1の活性を安定的に保持することのできる精製方法を見出すために、リン酸緩衝液に酵素精製の安定剤として用いられる物質を添加し、これらの溶液中で培養上清を透析することで検討した。

0.02 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に 2% Triton X-100、20 mM ジチオトレイトール (DTT)、0.1% コール酸、10% グリセリンを加え、各種外液 200 ml 中で培養上清 1 ml をマグネッススターラーにより攪拌しながら 4℃ で透析した。2 h 後、外液を新しい溶液に交換し、再び 4℃ で一晩透析した。透析後、セルロース膜より培養上清を採取し、これらの培養上清 0.5 ml と卵黄 PC 2.5 mg、ジエチルエーテル 0.5 ml をバイアル瓶中で混合し、6 h 振とう培養機で 200 rpm、10℃ で作用させた。各反応生成物の濃度を算出(算出方法は 2-2-2 に記載)した。そして、1 min に 1 μ mol の脂肪酸を産生する PLA1 の活性量を 1 U と定義し、評価した。

4-3 結果・考察

4-3-1 精製 PLA1 のリン脂質のアシル基への作用位置の確認

表 4-1 に示したように、精製 PLA1 は 16:0/18:1PC では反応生成物中の PC が 2 つの脂肪酸とも同じような組成であったが、LPC の脂肪酸組成は sn-2 位のオレイン酸の方が高濃度で残存した。さらに、この反応が脂肪酸特異性によるものでないことを証明するために脂肪酸組成を逆転させた 18:1/16:0 PC で行っても同じような結果が得られた。いずれの基質においても sn-2 位の脂肪酸が反応後の LPC に高濃度で残存していることから、精製 PLA1 においても培養上清と同様に sn-1 位の脂肪酸が選択的に加水分解していることが確認された。

表 4-1 精製 PLA による合成 PC の加水分解反応で生成した LPC および原料 PC の脂肪酸組成 (%) および加水分解率 (%)

(a) LPC および原料 PC の脂肪酸組成 (%)

	(%)			
	16:0/18:1PC		18:1/16:0PC	
	sn-1	sn-2	sn-1	sn-2
	16:0	18:1	18:1	16:0
PC	48.5	47.4	47.9	49.0
LPC	7.4	92.6	3.0	96.8

合成 PC, 5.0 mg; ジエチルエーテル, 0.5 ml; 精製 PLA1, 0.3 ml;

反応温度, 10℃; 振とう速度, 200rpm; 反応時間, 12 h

(b) 加水分解率(%)

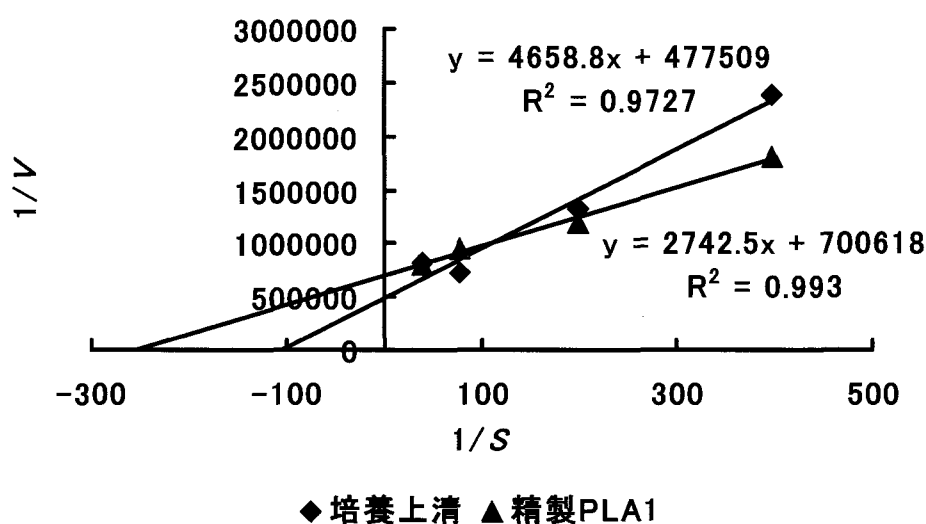
	(%)	
	16:0/18:1PC	18:1/16:0PC
加水分解率 (%)	29.3	34.1

条件は表 4-1 (b) と同じ

4-3-2 精製 PLA1 と培養上清の反応速度

図 4-1 および表 4-2 に示したように、培養上清に比べ、精製 PLA1 の K_m 値および V_{max} 値は低かった。 K_m 値が低いほど基質との親和性が高いことが知られているので、精製することで PLA1 と PC の親和性が高まったことが示唆された。培養上清中には培地成分としてバクトペプトンや酵母エキス、人工海水中的ミネラル成分などが含まれるほか、*Moritella* sp. HFHI0014 株より産生される様々な代謝産物が存在する。これより、本 PLA1 が精製することで基質との親和性が高まったことから、本 PLA1 は培養上清中のいずれかの物質に基質との作用を阻害されることが示唆された。

また、 V_{max} が精製することで低下した理由としては、培養上清と精製 PLA1 の酵素濃度が一定でなかったことや、精製過程で活性が低下したことなどが考えられる。



卵黄 PC, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 mg; ジエチルエーテル, 0.5 ml; 酵素液, 0.3 ml;
反応温度, 10℃; 振とう速度, 200 rpm; 反応時間, 30 min

図 4-1 培養上清と精製 PLA1 の Lineweaver-Burk プロット

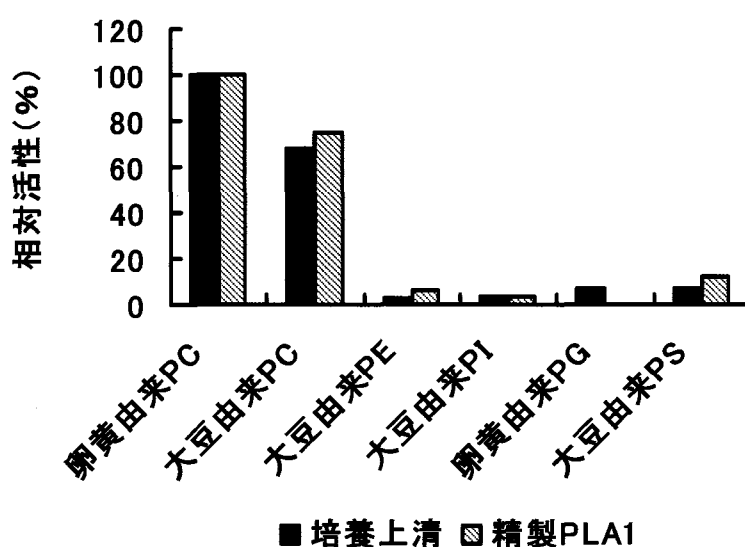
表 4-2 精製 PLA1 と培養上清の K_m および V_{max}

	K_m	V_{max} (mol/l · s)
培養上清	9.8×10^{-3}	2.1×10^{-6}
精製 PLA1	3.9×10^{-3}	1.4×10^{-6}

条件は図 4-1 と同じ

4-3-3 精製 PLA1 の基質特異性

図 4-2 に示したように、培養上清、精製 PLA1 とともに PE、PI、PG、PS に比べ、PC を基質とした際の脂肪酸生成量は著しく多く、本 PLA1 は PC への特異性が高いことが確認された。PC は自然界に最も多く存在するグリセロリン脂質であり、食品用途や化粧品用途に最もよく用いられている大豆や卵黄中においてもリン脂質の中で最も含有量の多い PC(表 2-4)を効率よく加水分解するという特徴は食品用途への応用に有用であるものであると考えられる。また、本 PLA1 は PS への反応率は低かった。生化学の分野では PA や PS に特異的に加水分解反応を行う PLA1 についての研究がよく行われているが、HFHI0014 株により生産される PLA1 はこれらの PLA1 とは異なる特異性を示した。



反応温度, 10 °C; ジエチルエーテル, 0.5 ml; リン脂質, 2.5 mg; 酵素液, 0.5 ml;
振とう, 200 rpm; 反応時間, 6 h

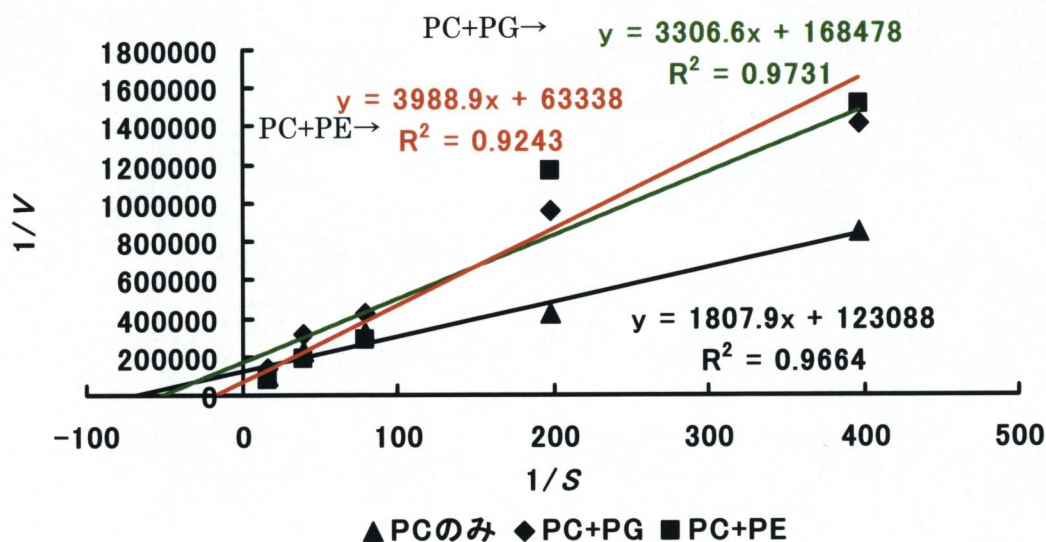
図 4-2 培養上清と精製 PLA1 の基質特異性

4-3-4 PLA1 と PC との反応に対する PE、PG の影響

表 4-4 に示したように、PC のみに比べ PC+PE では顕著に K_m 値は増加していた。 K_m 値は低いほど基質と酵素が結合しやすいことを示している。図 4-2 に示したように、本 PLA1 は PC を特異的に加水分解し、PE はほとんど加水分解されない。これより、表 4-3 で示した PC+PE の K_m 値の増加は、PE が PC と競合的に PLA1 に結合し、PE が加水分解されないことで、PC の加水分解を阻害していると考えられ、PE は PC の競合阻害剤的な役割を果たしていると考えられる。

PC+PG においても図 4-3 を見る限り、PE と同じような傾向がみられるが、表 4-3 に示すように、PC+PG は PC のみに比べて K_m 値の顕著な増加がみられなかった。しかしながら、図 4-4 では PG を加えることで PC が低濃度の際には加水分解率が PC のみに比べて低下していた。一般的に競争阻害を起こす物質の濃度が一定である場合には基質が高濃度である際には影響を及ぼさないが、低濃度の際には阻害を引き起こす。このことから、PG もまた PC に対して競争阻害的な作用を引き起こすことが示唆される。

競合阻害を引き起こす物質は一般的に代謝されない類似物質や基質の誘導体、酵素のもう一つの基質、反応生成物であることが多い⁷⁴⁾。PE および PG は PC と非常に類似した物質であるが、本 PLA1 ではほとんど加水分解されない。これより、PE、PG は本 PLA1 の基質との結合部位には結合するものの、加水分解されにくいため、PC との反応の際に競合阻害的な役割を果たすと考えられる。



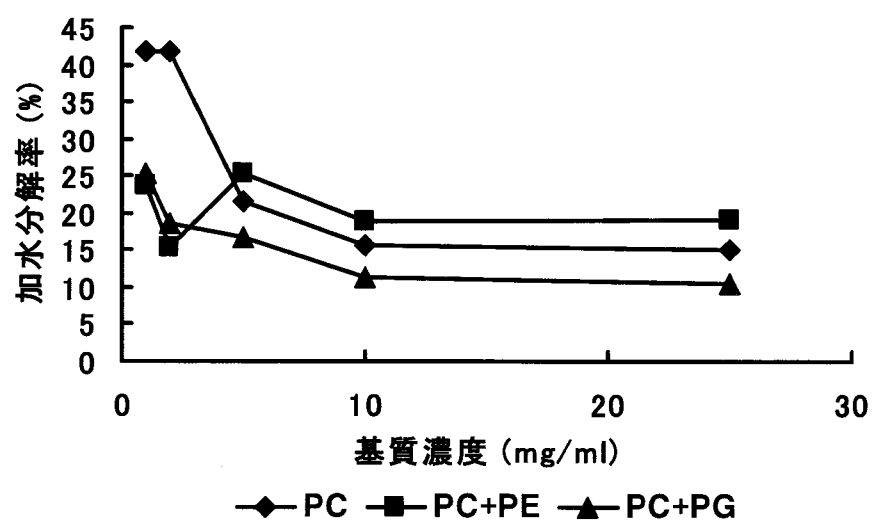
卵黄 PC, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 12.5 mg; PE, 0.5 mg; PG, 0.5 mg;
ジエチルエーテル, 0.5 ml; 培養上清, 0.5 ml; 反応温度, 10℃;
振とう速度, 200 rpm; 反応時間, 30 min

図 4-3 PE、PG 添加による Lineweaver-Burk プロットへの影響

表 4-3 PE、PG 添加による K_m と V_{max} への影響

	K_m	V_{max}
PC のみ	1.5×10^{-2}	8.1×10^{-6}
PC+PE	6.3×10^{-2}	1.6×10^{-5}
PC+PG	2.0×10^{-2}	5.9×10^{-6}

条件は図 4-3 と同じ

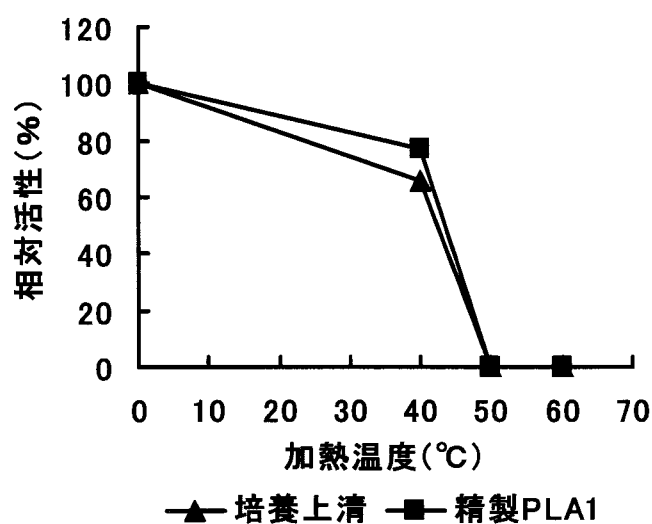


条件は図 4-3 と同じ

図 4-4 加水分解率の基質濃度による違い

4-3-5 精製 PLA1 の熱安定性

図 4-5 に示したように、培養上清中 PLA1、精製 PLA1 とともに 50℃、10 min の加熱で失活した。2-3-5 でも示したように、現在市販されている *Aspergillus* sp. や *Fusarium* sp. 由来の PLA1 は 70℃以上の加熱で失活するため、本 PLA1 は精製後も市販の PLA1 とは異なる低温で失活するという性状を保持していた。これより、本 PLA1 は熱による反応のコントロールが容易にであるため、タンパク質の変性や脂質の酸化を抑える必要のある食品加工において有用であり、PLA1 の食品加工における新たな用途の開発が期待される。

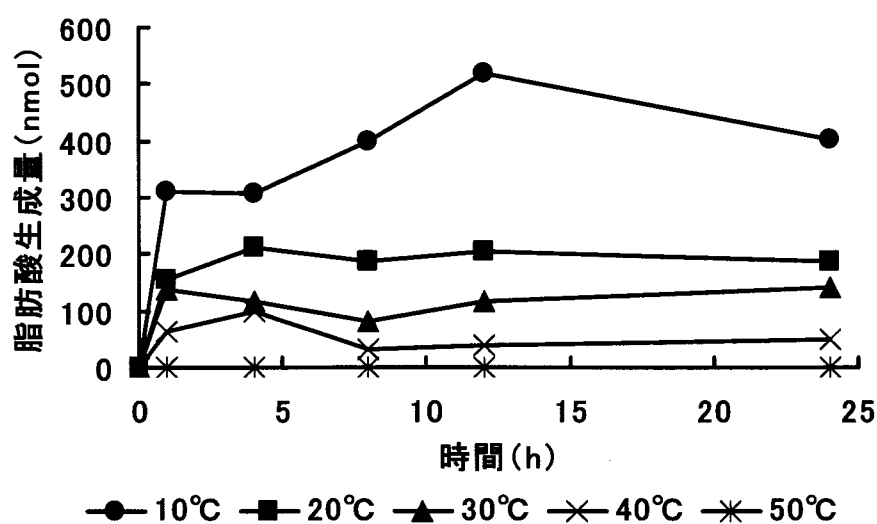


反応温度, 10℃; ジエチルエーテル, 0.5 ml; 卵黄 PC, 2.5 mg; 酵素液, 0.5 ml;
振とう, 200 rpm; 反応時間, 6 h; 加熱時間, 10 min

図 4-5 精製 PLA1 と培養上清の熱安定性

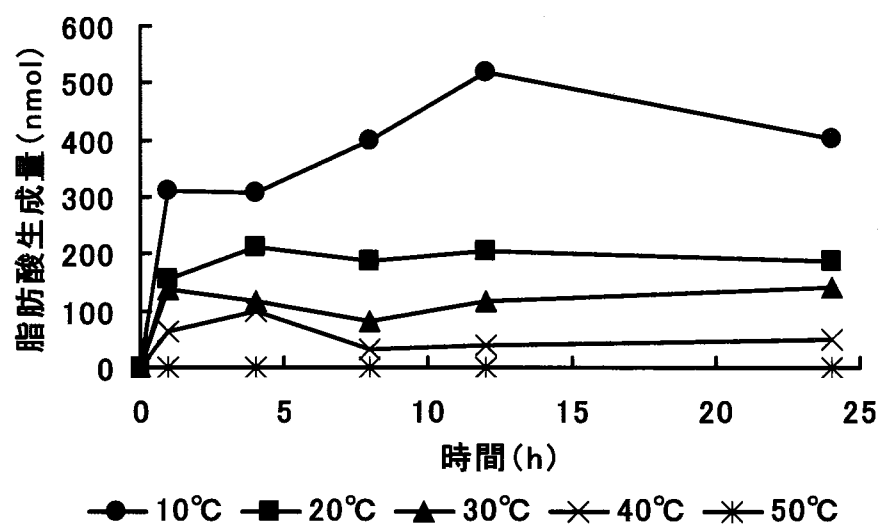
4-3-6 精製 PLA1 の至適温度

10℃から 40℃という温度域で至適温度の検討を行った結果、図 4-6、図 4-7 に示したように培養上清中 PLA1 および精製 PLA1 とともに 10℃という低温で最も高い活性を示した。この結果より、本 PLA1 は低温において最も効率的にリン脂質を加水分解することが確認され、現在産業に応用されていない低温で活性を示すホスホリパーゼを取得するという本研究の目的の一つは達成されたと考えられる。また、低温において食感や物性等の改質を行うことが望ましい食品等に用いる際には、既存の PLA1 と比較すると有利であると考えられる。



反応温度, 10℃; ジエチルエーテル, 0.5 ml; 卵黄 PC, 2.5 mg; 酵素液, 0.5 ml;
振とう, 200 rpm

図 4-6 精製 PLA1 の至適温度



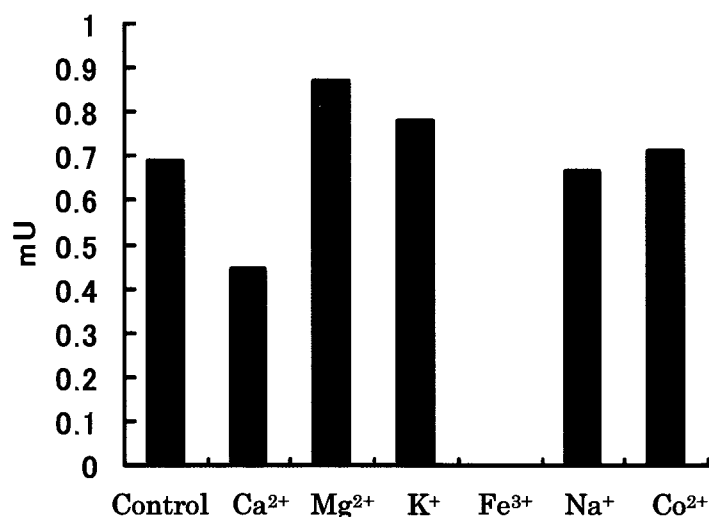
条件は図 4-6 と同じ

図 4-7 培養上清中 PLA1 の至適温度

4-3-7 精製 PLA1 の金属イオンの影響

図 4-8 に示したように、 Mg^{2+} を加えた際に PLA1 活性が向上する傾向がみられた。 Mg^{2+} は食品中に含まれている物質であり、本 PLA1 を食品加工に用いる際に Mg^{2+} を活性向上剤として混合することは低濃度であれば、安全性の観点から問題は無いと考えられる。

また、 Ca^{2+} を加えた際には活性が減少し、 Fe^{2+} を加えた際には活性はみられなかった。これより、本 PLA1 は Ca^{2+} および Fe^{3+} により阻害をうけることがわかった。PLA1 および PLA2 には Ca^{2+} により活性が向上するものは多くある。例えば、豚脾臓由来 PLA2⁸⁷⁾やラットの海馬由来 PLA2⁸⁸⁾は活性を示すために数 mM の Ca^{2+} を必要とする。本 PLA1 は Ca^{2+} により阻害を受けるため、これらの酵素とは異なる作用をもつことが示唆された。

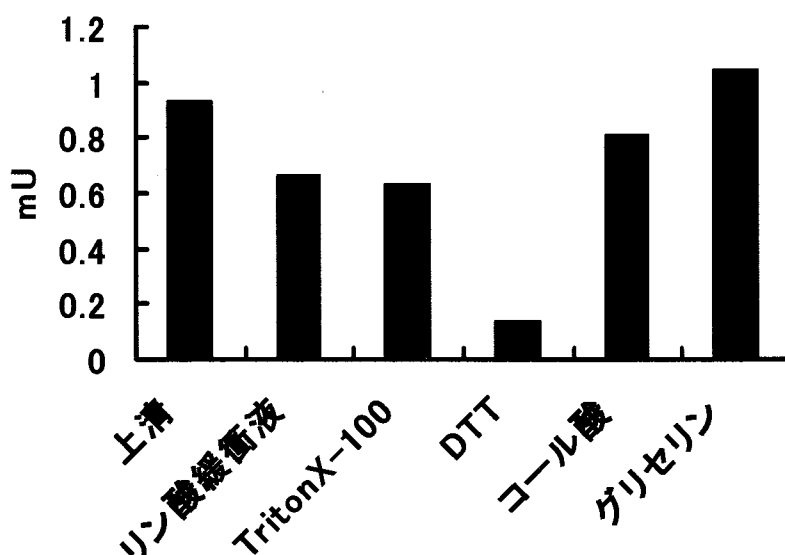


反応温度, 10℃; ジエチルエーテル, 0.5 ml; リン脂質, 2.5 mg; 酵素液, 0.5 ml;
金属イオン, 20mM; 振とう, 200 rpm; 反応時間, 6 h

図 4-8 精製 PLA1 の金属イオンの影響

4-3-8 PLA1 活性の安定な精製方法の検討

PLA1 活性のリン酸緩衝液中での安定剤の検討を行った結果、図 3-6 に示したように、リン酸緩衝液のみで透析を行った培養上清は透析を行う前に比べて活性の減少がみられたが、10 %グリセリンを加えたリン酸緩衝液にて透析を行ったところ活性の減少はみられなかった。グリセリンは細菌の保護剤や酵素の安定化剤として知られており、その使用例は多くある。この結果より、本 PLA1 の精製に用いるリン酸緩衝液中に 10% グリセリンを加えることで PLA1 活性を安定に保持することができ、精製後の比活性も向上すると考えられる。



反応温度, 10℃; ジエチルエーテル, 0.5 ml; 卵黄 PC, 2.5 mg; 培養上清, 0.5 ml;
振とう, 200 rpm; 反応時間, 6 h

図 4-9 PLA1 の透析における安定剤の検討

第5章 HFHI014 株からの PLA1 をコードする遺伝子の取得検討

5-1 序論

第4章に示したように、本 PLA1 は 10℃ という低温で効率的にリン脂質を加水分解することができ、50℃、10min の加熱で失活するという、現在市販されている *Aspergillus* sp. や *Fusarium* sp. 由来の PLA1 とは異なる性状をもつ。この性状は脂質の酸化やタンパク質の変性を抑える必要のある食品加工に有用であり、PLA1 の産業における新たな用途の開発が期待される。

以上のような有用性をもつ HFHI0014 株の有する PLA1 を産業に応用するためには、PLA1 の大量発現系の検討が必要となる。PLA1 の大量発現系を確立するためには PLA1 をコードする遺伝子を取得し、この遺伝子をタンパク質の大量発現が知られている大腸菌や酵母などに導入や遺伝子配列を改変する方法が一般的に知られている。また、本 PLA1 の遺伝子配列を解析することで、既知の PLA1 との類似性や活性中心などの基本的な情報を得ることができる。

本章では HFHI0014 株から PLA1 をコードする遺伝子を解析するための検討について示す。遺伝子の解析検討では既知の PLA1 において相同性の高い配列をもとに作製したプライマーを用いた PCR、N 末端アミノ酸配列をもとに作製したプライマーを用いた PCR、コスミドライブラリーを用いた大腸菌による発現スクリーニングを行った。

5-2 実験方法

5-2-1 HFHI0014 株のゲノム DNA の抽出

HFHI0014 株のグリセロールストックを K28 液体培地 10 ml に植菌し、10℃ で 96 h 振とう培養した。培養液から 2ml 採取し、K28 液体培地 200 ml に加え、再び 10℃ で 72 h 振とう培養した。この培養液 50 ml を 4℃ で遠心分離 (3500 rpm、20 min) し、上清を捨て、沈殿を HFHI0014 株の菌体サンプルとした。この菌体サンプルに TE 溶液 (10 mM Tris-HCl、1 mM EDTA) 850 μ l を加え、懸濁し、425 μ l づつ新しいチューブに分注した。この菌体溶液に 20 % SDS 11 μ l、20 mg/ml proK (タカラバイオ (株)) 2 μ l を加え、37℃ で 1 h インキュベートした。その後、5 M NaCl 75 μ l、CTAB/NaCl 溶液 (1% セチルトリメチルアンモニウムブロマイド、50 mM Tris-HCl、0.7 M NaCl、10 mM EDTA) 60 μ l を加え、65℃ で 10 min インキュベートした。その後、イソamilアルコール:クロロホルム=1:24 を 500 μ l 加え、攪拌し、遠心分離 (12000 rpm、3 min) した。上層を採取し、そこに PCI (フェノール:クロロホルム:イソamilアルコール=25:24:1) 500 μ l を加え、攪拌し、遠心分離 (12000 rpm、3 min) した。上層を採取し、イソプロパノール 330 μ l を加え、攪拌し、遠心分離 (14000 rpm、5 min) した。上層を捨て、沈殿に 70%エタノール 1 ml を加え、遠心分離 (14000 rpm、5 min) した。上層を捨て、各チューブに TE 100 μ l を加え、沈殿を溶解し、RNase (タカラバイオ

(株)) 1 μ l を加え、37℃で 30 min インキュベートし、RNA を除いた。これを HFHI0014 株のゲノム DNA サンプルとした。

5-2-2 既知 PLA1 において相同性の高い配列より作製したプライマーを用いた PCR

既知の PLA1 遺伝子配列の相同性検索を行い、相同性がみられた領域のアミノ酸配列をもとにプライマーを作製し、HFHI0014 株の DNA の PCR を行うことで、PLA1 遺伝子の断片の取得を試みた。

Moritella sp. HFHI0014 株はグラム陰性菌であることから、グラム陰性菌の PLA1 産生菌の PLA1 遺伝子の相同性検索を GENETYX-MAC の Multiple Alignment を用いて行った。相同性検索を行った PLA1 産生菌は *Shewanella baltica*, *Shewanella putrefaciens*, *Pseudoalteromonas atlantica*, *Psychrobacter cryohalolentis*, *Yersinia pseudotuberculosis* IP 32953, *Acidovorax avenae subsp. citrulli* AAC00-1, *Polaromonas naphthalenivorans* CJ2 の 7 株である。相同性検索の結果、図 5-1 のように 3 つの領域に高い相同性がみられたため、このうち塩基配列の組み合わせの数が少ない領域 b と領域 c からプライマーを作製した。

HFHI0014 株のゲノム DNA を TE により 10⁻¹、10⁻²、10⁻³ に段階希釈した。各段階の DNA 溶液 1 μ l に 10 \times PCR buffer (タカラバイオ (株)) 2.5 μ l, dNTP mixture (タカラバイオ (株)) 2.5 μ l, プライマー b (5'-GAY GAY AAY CCN DA-3') 1.0 μ l, プライマー c (5'-TC NCC RTA NCC RTT RAA-3') 1.0 μ l, ex-taq polymerase (タカラバイオ (株)) 0.1 μ l, 蒸留水 16.9 μ l を混合し、PCR にかけた (温度条件:95℃, 1 min, 95℃, 30 sec, 50℃, 30 sec, 72℃, 4 min, 30 サイクル)。PCR 後、試料 5 μ l に 0.5 μ l の 10 \times Loading Dye (タカラバイオ (株)) を加え、1%アガロースゲルに添加し、分子量マーカー (DNA Digested Marker (タカラバイオ (株))) とともに、TAE 溶液 (2 M Tris 塩基, 1 M 酢酸, 50 mM EDTA) 中で 100 V, 15 min 泳動した。泳動後、ゲルに UV を照射し、DNA の増幅の有無を確認した。

			a	
Sb-PLP-aa	113	QVYNKDTSSPFRETNHEPEVFMFLFNNDWKIG-SVTNSFWGIGAVHQSNKSGPLSRSWNR		171
Sp-PLP-aa	112E.....I.....F.....L.....		170
Aa-PLP-aa	227	.LFSP.I.R...A.D...MYVYPT.ARLPFGWRWRY.S.V.L...QNL.....		286
Pa-PLP-aa	113	.A..GEI.A.....Y...IIFNYSRP.SLL-GLPIEQTFVSLN...QT.E.....		171
Pc-PLP-aa	294	...E.N.R...A.DYQ..I.LTQPVTANLPFGGRLRML.A..I.H...QDD.....		353
Pn-PLP-aa	216	.LF.GGL.R...T.D...LVYIYPHQIALPGGWNYRLS.V.L...Q.E.....		275
Yp-PLP-aa	119	.AS.SEE.....Y..QL.LAWST.YELA-GW.FREVEF.FN...AD.T.....		177
		* .. * **.*.....*		
		b		
Sb-PLP-aa	172	LYATMIF-DAGPLAFSTKVWWRIPEDEKTDPHQARGDDNPNIDDYIGRAEFIVGYGI-DE		229
Sp-PLP-aa	171	I.G....-.....A..I.....Y..S.....E..V.N.....V..		228
Aa-PLP-aa	287	V.--LM---TG.ELDNRTVNARVWKRLK-ES.GD...D.I..M..G.MQLGWNYDRD		339
Pa-PLP-aa	172	IIGGVV.AQNAVVTWGLRT.....ED.QSFDDPD...Y.ER.M.YG.IG..WS.S.N		231
Pc-PLP-aa	354	A.--VM---AGAEWG-.LSVIPRFWLRVNNENDSSE...D.E.FM.YGDIKFL.DLPNQ		406
Pn-PLP-aa	276	T.--LMGAAEKV.GPESSLRLQGRWDRMH-ESPAD...G.ENF....LNATWQ.NKA		332
Yp-PLP-aa	178	V..TRVMA-QR.N.EIDL.P.Y....SD-----SK...D.TK.M.YYRLKVG.AL-GD		228
		*** *		
		c		
Sb-PLP-aa	230	HRFTLTLTKNLEIDRGSaelTWSYPIVG-----NLRlyTQYfNGYGESLIDYNYHNQ		282
Sp-PLP-aa	229RS..Q.....		281
Aa-PLP-aa	340	NTLS..ARSAFGSTG...VR.E.LRAVGNDLGGIQS...FH.SL.S...DTIT...RRRT		399
Pa-PLP-aa	232	.TLE.L.RN..RSDN..AVQ.G.TF..TR-----H..G.VE.....Y..Q.T.		284
Pc-PLP-aa	407	QSLSG..RY.-PGTNK.A.QIDYI..LSK-----VNGFV.L.Q....IV...HE.T		458
Pn-PLP-aa	333	NTLGV..RHS.HREAK..TRID.MMAPAA--SPNYTG..YHV.L....D..L...KRRN		390
Yp-PLP-aa	229	SV.S.DGRY.W-NTGY.G..MG....TK-----HV.F...V.S....M...FRQT		280
		* .. *		

※ 図中の a, b, c は相同性の高い領域である。

※図中の菌株名の略語

略語	菌株名
Sb-PLP-aa	<i>Shewanella baltica</i>
Sp-PLP-aa	<i>Shewanella putrefaciens</i>
Aa-PLP-aa	<i>Acidovorax avenae subsp. citrulli</i> AAC00-1
Pa-PLP-aa	<i>Pseudoalteromonas atlantica</i>
Pc-PLP-aa	<i>Psychrobacter cryohalolentis</i>
Pn-PLP-aa	<i>Polaromonas naphthalenivorans</i> CJ2
Yp-PLP-aa	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> IP 32953

図 5-1 既知 PLA1 遺伝子の相同性

5-2-3 N末端アミノ酸配列をもとに作製したプライマーを用いた PCR

3-3-6 に示した HFHI0014 株の有する PLA1 の N 末端アミノ酸配列より塩基配列の組み合わせが最も少ない領域からプライマーを作製し、HFHI0014 株の DNA の PCR を行うことで、PLA1 遺伝子の断片の取得を試みた。N 末端アミノ酸配列をもとに作製したプライマーの配列は 5'-GAR TTY ATH CAN ATH GG-3'であり、これをプライマー-n とした。

HFHI0014 株のゲノム DNA 10 μ l に、蒸留水にて 10 倍希釈した sau3AI (タカラバイオ (株)) 0.8 μ l、sau3AI 反応バッファー (タカラバイオ (株)) 10 μ l、蒸留水 80 μ l を混合し、30℃で 30 min インキュベートした。その後、65℃で 10 min インキュベートし、混合溶液に PCI を 100 μ l 加え、攪拌し、遠心分離 (12000 rpm、3 min) した。上層を採取し、イソアミルアルコール:クロロホルム=1:24 を 500 μ l を加え、攪拌し、遠心分離 (12000 rpm、3 min) した。上層を採取し、99 %エタノール 250 μ l および 3 M 酢酸ナトリウム 10 μ l、エタ沈メイト (ニッポン・ジーン) 1 μ l を加え、攪拌し、遠心分離 (14000 rpm、10 min) した。上清を捨て、沈殿に 70 %エタノール 1 ml を加え、遠心分離 (14000 rpm、5 min) した。上清を捨て、沈殿を TE 10 μ l に溶解し、DNA 断片溶液とした。

本実験の PCR は TaKaRa LA PCR *in vitro* Cloning Kit (タカラバイオ (株)) を用いて行った。DNA 断片溶液 5 μ l、Sau3AI Cassette 2.5 μ l、Ligation Hi (タカラバイオ (株)) 4 μ l を混合し、16℃で 30 min インキュベートした。このライゲーションサンプル 1 μ l に 10 \times LA PCR buffer 5.0 μ l、dNTP mix 5.0 μ l、プライマー-n 1.0 μ l、Primer C1 (Kit 中のプライマー) 1.0 μ l、ex-taq polymerase 0.5 μ l、蒸留水 36.5 μ l を混合し、PCR にかけた (温度条件:95℃, 1 min、94℃, 30 sec、55℃, 30 sec、72℃, 4 min、30 サイクル)。PCR 後、この反応液を蒸留水にて 1~10⁻³ まで段階希釈した。各段階の反応液各 1 μ l に 10 \times LA PCR buffer 5.0 μ l、dNTP mix 5.0 μ l、プライマー-n 1.0 μ l、Primer C2 (TaKaRa LA PCR *in vitro* Cloning Kit 中のプライマー) 1.0 μ l、ex-taq polymerase 0.5 μ l、蒸留水 36.5 μ l を混合し、PCR にかけた (温度条件:95℃, 1 min、94℃, 30 sec、55℃, 30 sec、72℃, 4 min、30 サイクル)。この反応液 1 μ l に 0.5 μ l 10 \times ローディングバッファーを加え、1 %アガロースゲルに添加し、TAE 溶液中で 100 V、15 min 泳動した。泳動後、ゲルに UV を照射し、DNA の増幅を確認した。

PCR において、DNA の増幅が最も多かったサンプル溶液を前述の方法と同様に PCI およびイソアミルアルコール:クロロホルム=1:24 により処理し、エタノールにより沈殿した DNA 断片を TE 5 μ l に溶解し、濃縮した。濃縮したサンプル溶液 2 μ l に T vector 0.5 μ l、Ligation Hi 2 μ l を加え、16℃で一晩インキュベートした。ライゲーションサンプルの全量 4.5 μ l をコンピテントセル (大腸菌 XL1-BLUE) 45 μ l に加え、氷上で 30 min 放置した後、42℃で 45 sec インキュベートした。その後、SOC 液体培地 (2% Trypton、0.5% Yeast extract、0.5% NaCl、0.0186% KCl、2 mM MgCl₂、4 mM グルコース、濃水酸化ナトリウム 適量) を 450 μ l 加え、37℃で 1 h 振とうした。溶液を遠心分離 (2 min、6000 rpm) し、上清を 350 μ l 捨て、残りを懸濁した後、50 μ l ずつ AX-Gal 寒天培地 (1.6 % トリプトン、1% 酵母エキス、0.5% NaCl、1.5% 寒天、100 μ l/ml アンピシリン、0.02% IPTG、30 μ l/ml X-gal) に塗布し、37℃で一晩インキュベートした。インキュベート後、生育してきた青いコロニー

(ベクターに DNA 断片が結合していないもの)と白いコロニー(ベクターに DNA 断片が結合しているもの)のうち白いコロニーを採取し、LB 培地に植菌し、一晩振とう培養した。培養液を遠心分離(6000 rpm、2 min)し、上清を除き、沈殿である菌体を採取した。菌体から GenElute Plasmid Miniprep Kit (Sigma) を用いてプラスミドを抽出した。抽出したプラスミド溶液 100 μ l より 1.0 μ l を採取し、EcoRI 0.25 μ l、EcoRI の反応バッファー 1.0 μ l、蒸留水 7.75 μ l を加えて混合し、37℃で 1 h インキュベートし、この反応液 1 μ l に 0.5 μ l 10×ローディングバッファーを加え、1 %アガロースゲルに添加し、TAE 溶液中で 100 V、15 min 泳動した。泳動後、ゲルに UV を照射し、DNA 断片のインサートの有無を確認した。

DNA 断片のインサートがなされたプラスミド溶液 5 μ l、Sau3AI Cassette 2.5 μ l、Ligation Hi (タカラバイオ(株)) 4 μ l を混合し、16℃で 30 min インキュベートした。このライゲーションサンプル 1 μ l に 10×LA PCR buffer 5.0 μ l、dNTP mix 5.0 μ l、プライマー n 1.0 μ l、Primer C1 (Kit 中のプライマー) 1.0 μ l、ex-taq polymerase 0.5 μ l、蒸留水 36.5 μ l を混合し、PCR にかけた(温度条件:95℃ 1 min、95℃ 10 sec、55℃ 5 sec、72℃ 4 min、30 サイクル)。PCR 反応溶液を前述の方法と同様に PCI およびイソアミルアルコール:クロロホルム=1:24により処理し、採取した上層に 125 mM EDTA 5.0 μ l および 99 % エタノール 60 μ l を加え、15 min 室温にてインキュベートした。その後、遠心分離(14000 rpm、20 min)し、上清を捨て、70 % エタノール 60 μ l を加え、(14000 rpm、10 min)し、上清を除いた後、風乾し、蒸留水 100 μ l に溶解し、塩基配列分析用のサンプルとした。塩基配列分析は 3130 xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) によって行った。

5-2-4 コスミドライブラリーによる発現スクリーニング

コスミドベクターに HFHI0014 株の DNA 断片を挿入し、大腸菌 XL1-BLUE に導入し、リン脂質を含む培地にて培養し、ハ口の形成を確認することで PLA1 活性を発現する大腸菌の取得を試みた。

Sau3A1 反応バッファーにより 1600 倍に希釈した sau3A1 溶液 1.0 μ l と HFHI0014 株 DNA 25 μ l、10 \times Sau3AI 25 μ l、蒸留水 200 μ l を混合し、37 $^{\circ}$ C で 30 min インキュベートし、65 $^{\circ}$ C で 10 min インキュベートした。この DNA 断片溶液を 5-2-3 に記載した方法で PCI およびイソアミルアルコール:クロロホルム=1:24 により処理し、エタノールにより沈殿した DNA 断片を TE 50 μ l に溶解した。この溶液に Alkaline phosphatase (タカラバイオ (株)) 20 μ l、10 \times Alkaline phosphatase 反応液 (タカラバイオ (株)) 10 μ l、蒸留水 30 μ l を加え、37 $^{\circ}$ C で 1 h インキュベートし、DNA 断片を脱リン酸化した。0.5 M EDTA 3 μ l を加え、65 $^{\circ}$ C で 10min インキュベートした。この DNA 断片溶液を 5-2-3 に記載した方法で PCI およびイソアミルアルコール:クロロホルム=1:24 により処理し、エタノールにより沈殿した DNA 断片を TE 3 μ l に溶解した。この溶液 2.5 μ l にコスミドベクターである SuperCos1(Stratagene Corporation) 1 μ l、Ligation Hi 2.5 μ l を加え、16 $^{\circ}$ C で一晩インキュベートした。このライゲーションサンプル全量 4.5 μ l に MaxPlax Lamdba packaging extracts (Epicentre Biotechnologies Coporation) 25 μ l を加え、30 $^{\circ}$ C で 90 min インキュベートし、再び MaxPlax Lamdba packaging extracts 25 μ l を加え、さらに 30 $^{\circ}$ C で 90 min インキュベートした。その後、SM バッファー 500 μ l を加えて混合した後、クロロホルム 25 μ l を加えさらに混合した。

大腸菌 XL1-Blue を感染用の LB 培地 (1.0% トリプトン、0.5% 酵母エキス、0.5% NaCl、0.02% マルトース、0.01 M MgSO₄) 3ml にて 6 時間培養し、培養液 1ml を遠心分離 (2 min、6000 rpm) し、上清を捨て、集菌し、10mM MgSO₄ 100 μ l に再懸濁した。この菌液 100 μ l にパッケージングした HFHI0014 株のコスミドベクター溶液 100 μ l を加え、室温で 30 min 放置した。その後、LB 培地 500ml を加え、37 $^{\circ}$ C で 1 h 振とうした。遠心分離 (6000 rpm、2 min) し、上清を 650 ml を捨て、残りの溶液 50 μ l をアンピシリンを含む LB 寒天培地 (1.0% トリプトン、0.5% 酵母エキス、1.5% 寒天、0.5% NaCl、100 μ g/ml アンピシリン) に塗布し、37 $^{\circ}$ C で一晩培養した。培養後、培地上に LB 液体培地を少量加え、生育した大腸菌を採取し、40% グリセリン溶液を 500 μ l、100 mg/ml アンピシリン 1 μ l を加え、-80 $^{\circ}$ C にて保存した。このグリセロールストックした大腸菌をコスミドライブラリーとした。

コスミドライブラリーの大腸菌を LB 培地に植菌し、37 $^{\circ}$ C で 6 時間培養した後、培養液を 10⁻⁷に蒸留水にて希釈し、この菌液 50 μ l をリン脂質を含むスクリーニング用培地である PCY 改 (1.0% トリプトン、0.5% 酵母エキス、1.5% 寒天、0.5% NaCl、0.5% コール酸ナトリウム、1.5% 卵黄リン脂質、20 mM CaCl₂、100 μ g/ml アンピシリン) に塗布した。37 $^{\circ}$ C で一晩培養した後、20 $^{\circ}$ C に温度を変え再び一晩培養し、ハ口の形成を確認した。

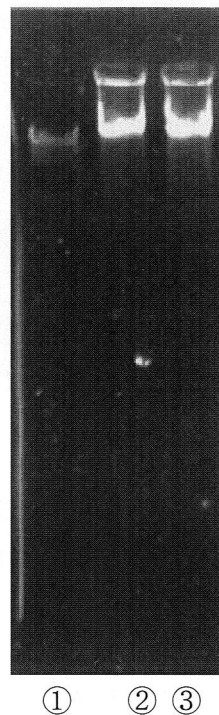
また、コスミドライブラリーの大腸菌の菌体内タンパク質の PLA1 活性の発現についても確認した。コスミドライブラリーの大腸菌を LB 培地 3 ml に植菌し、30 $^{\circ}$ C で一晩培養した後、培養液 1.5 ml を遠心分離 (6000 rpm、2 min) し、上清を捨て、集菌した。これに、BugBuster

Protein Extraction reagent (タカラバイオ (株)) 500 μ l を加え、懸濁し、室温にて 20 min 振とうした。そして、4℃で遠心分離 (12000 rpm、20 min) し、上清を採取した。この上清 0.3 ml をジエチルエーテル 0.5 ml、卵黄 PC 2.5 mg とともにバイアル瓶中で混合し、18 時間振とう培養機で 200 rpm、10℃で反応させた。各反応生成物を Folch 法により抽出し、TLC により FA の有無を確認した (条件は 2-2-2 に記載)。

5-3 結果・考察

5-3-1 HFHI0014 株のゲノム DNA の抽出

HFHI0014 株より抽出したゲノム DNA の電気泳動結果を図 5-2 に示した。図 5-2 に示したように、高濃度のゲノム DNA を抽出されていることが確認された。また、RNA のバンドはみられず、RNA はほぼ取り除かれていることが確認された。この結果より、抽出した DNA サンプルを用いて実験を進めることが可能であると考えられる。



① マーカ

②③ HFHI14 株より抽出した DNA

図 5-2 HFHI0014 株より抽出した DNA の電気泳動図

5-3-2 既知 PLA1 において相同性の高い配列より作製したプライマーを用いた PCR

既知の PLA1 遺伝子配列の相同性検索を行い、相同性がみられた領域のアミノ酸配列をもとに作製したプライマーを用いた HFHI0014 株の PCR の反応液の電気泳動図を図 5-3 に示した。図 5-3 に示したように、DNA 断片の増幅はみられなかった。この結果より、図 5-1 に示した既知の PLA1 遺伝子配列における相同性の高い領域 b および c は HFHI0014 株の DNA にはどちらか一方もしくは両方が存在しないことが示唆された。また、HFHI0014 株の N 末端アミノ酸配列と高い相同性を示す既知の PLA1 が無かったことと、今回の結果より本 PLA1 は既知の PLA1 とは異なった配列を持つことが示唆された。



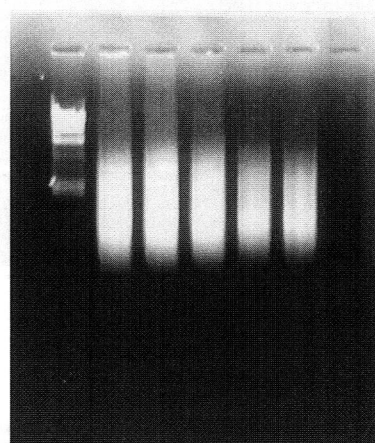
- ①マーカー ②HFHI0014 株 DNA 希釈なし ③HFHI0014 株 DNA 10^{-1} 希釈
④HFHI0014 株 DNA 10^{-2} 希釈 ⑤HFHI0014 株 DNA 10^{-3} 希釈

図 5-3 相同性の高い配列により作製したプライマーによる PCR 結果

5-3-3 N末端アミノ酸配列をもとに作製したプライマーを用いた PCR

HFHI0014 株の有する PLA1 の N 末端アミノ酸配列より作製したプライマーを用いた HFHI0014 株 DNA の PCR の反応液の電気泳動結果を図 5-4 に示した。図 5-4 に示したように、多くの DNA 断片の増幅がみられた。その中でも特に多くの増幅がみられた 2 回目の PCR の希釈を行わなかった反応液をコンピテントセルに導入した。

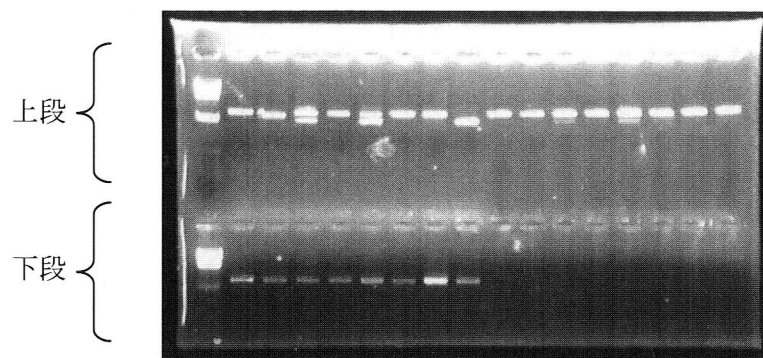
PCR 産物をコンピテントセルに導入したところ、PCR 産物が結合した T vector を導入しているとみられる 63 株の白いコロニーを取得した。この 63 株の白いコロニーのインサートの確認をしたところ、図 5-7 に示したように、検体 3、5、58 の 3 株のみにインサートが確認された。この 3 株の塩基配列を解析したが、既知の PLA1 と相同性の高いものはなく、本 PLA1 遺伝子断片と推定されるものを取得することは出来なかった。



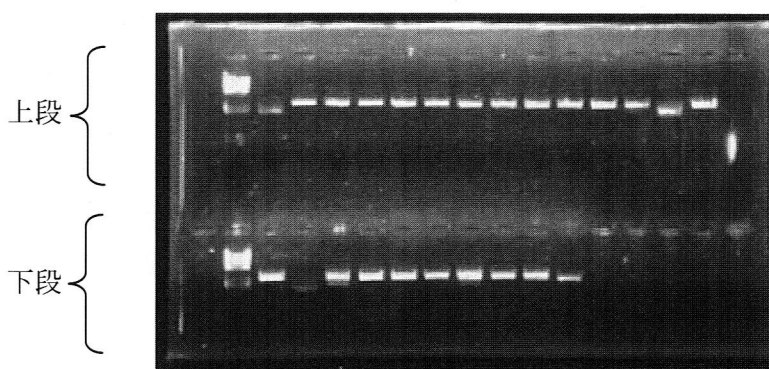
① ② ③ ④ ⑤ ⑥

①マーカー ②1回目の PCR 産物 ③2回目の PCR 産物 希釈なし
④2回目の PCR 産物 10^{-1} 希釈 ⑤2回目の PCR 産物 10^{-2} 希釈
⑥2回目の PCR 産物 10^{-3} 希釈

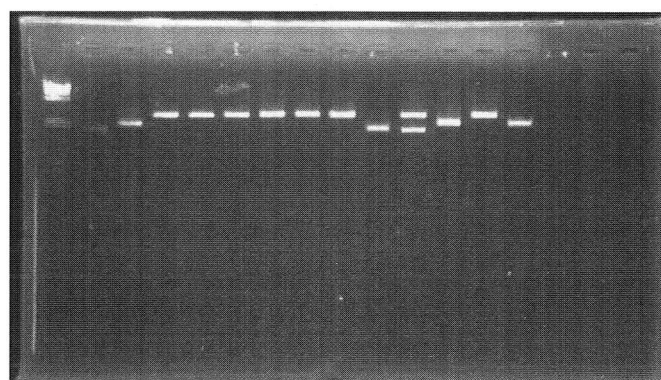
図 5-4 N 末端アミノ酸配列より作製したプライマーによる PCR 結果



① | 上段 1~16 |
 | 下段 17~24 |



① | 上段 25~38 |
 | 下段 39~49 |



① | 49~63 |
 ① マーカー

図 5-7 インサートチェック結果

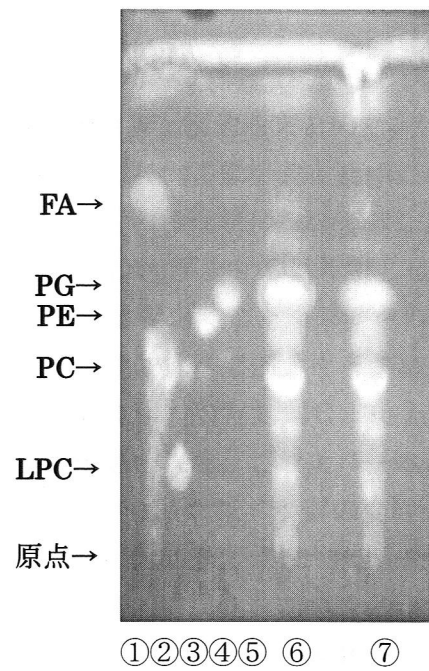
5-3-4 コスミドライブラリーによる発現スクリーニング

HFHI0014 株の DNA 断片を結合したコスミドベクターを大腸菌 XL1-Blue に導入したところ、約 7000 株の菌株を取得し、6 本のグリセロールストックを作製し、これを HFHI0014 株 DNA のコスミドライブラリーとした。

HFHI0014 株 DNA のコスミドライブラリーからリン脂質を含む寒天培地 PCY 改により約 10000 株のスクリーニングを行ったところハロを形成する菌株を見出すことは出来なかった。

また、6 本のグリセロールストックから培養した大腸菌の菌体内タンパク質を抽出し、卵黄 PC と作用させたところ、図 5-8 に示したように、2 本のグリセロールストックに PLA 活性が検出された。

本 PLA1 は 10℃ で最も活性が高く、30℃ 以上の反応温度ではその活性は著しく低下する。寒天培地を用いたスクリーニングでは培養温度が 37℃ であったために、PLA1 が発現されたとしても著しく低いためにハロが形成されなかったことが示唆される。また、グラム陰性菌である *Serratia* MK-1 由来 PLA1 を大腸菌にて発現させたところ、菌体外に比べ菌体内の PLA1 の分泌量が多いという報告がある³⁸⁾。本実験においても菌体内より抽出したタンパク質溶液に PLA 活性が見られ、この報告との関連性が認められる。しかしながら、現在数百株が混在した状態での活性試験において PLA 活性が認められた段階であり、今後、単菌レベルでの菌体内タンパク質の抽出を行い活性試験を行うことで PLA1 活性を発現する大腸菌を取得することができ、PLA1 遺伝子の解析を行うことができると考えている。



①FA ②PC ③LPC ④PE ⑤PG ⑥⑦コスミドライブラリー

反応温度, 10 °C; ジエチルエーテル, 0.5 ml; リン脂質, 2.5 mg; 酵素液, 0.5 ml;
振とう, 200 rpm; 反応時間, 6 h

図 5-8 コスミドライブラリーの大腸菌の菌体内タンパク質中の PLA1 活性の検出

第6章 総括

最初に、第1章では本研究の背景と目的をまとめた。

第2章では、*Moritella* sp. HFHI0014 株培養上清中に存在することを確認したホスホリパーゼである PLA1、PLC、LPLC の諸性状について示した。培養上清の反応生成物の経時変化を調べたところ、反応初期は PLA1 が優先的に作用して LPC が生成し、その LPC に LPLC が作用して、LPC が MG に変化していくことが確認された。一方、DG の生成は少量であることから、PLC 活性は PLA1 活性に比べて弱いことが確認された。培養上清の熱安定性を調べたところ、PLA1 活性および LPLC 活性は 50℃、10 min の加熱で、PLC 活性は 40℃、10 min の加熱で失活することが確認された。これより、本培養上清中ホスホリパーゼは比較的低温条件での失活が可能なことから、タンパク質の変性や脂質の酸化を抑える必要のある食品への応用が期待される。培養上清の PC、PE、PG、PS、PI に対する基質特異性を調べたところ、PLA1 は PC に対して高い特異性をもつことがわかった。一般に、我々が食品として摂取しているリン脂質の多くは PC であり、本 PLA1 は PC を効率的に加水分解することから、食品加工への応用が期待できる。また、PLC 活性は PLA1 活性ほど基質に対する顕著な特異性はみられなかった。この結果より、PLC は活性は低いものの多種のリン脂質を除去することができ、精油工程における多種のリン脂質の除去に応用が期待できる。培養上清の卵黄、大豆、イカ由来のリン脂質の加水分解特性を調べたところ、HFHI0014 株培養上清中の PLA1 は卵黄およびイカ由来のリン脂質を効率よく加水分解することができ、乳化剤や生理活性物質の生産に有用であると考えられる。また、大豆由来のリン脂質では卵やイカ由来のリン脂質比べて、PC 含量が少ないため、PLA1 によるリン脂質の分解があまり進行していなかった。培養上清中 PLA1 の反応速度を調べた結果、HFHI0014 株培養上清 0.5ml 中の PLA1 の 30 min の反応における LPC の生成量は約 400 nmol が最大であった。また、ミカエリス定数 K_m は $K_m=1.5 \times 10^{-2}$ であり、反応の最大速度 V_{max} は $V_{max}=1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/l} \cdot \text{s}$ であった。また、培養上清の 4℃における安定性を評価したところ、7日まで PLA1、PLC 活性は保持されていた。また、LPLC 活性も少なくとも4日間は活性が保たれることが確認された。タンパク質の精製は一般的に 4℃で行われることから、本ホスホリパーゼは少なくとも4日間の安定性が認められたため、4℃での精製は可能であることが示唆された。培養上清の分子量分画を行ったところ、培養上清中 PLA1 の分子量は 50,000~100,000 M.W.、PLC および LPLC の分子量は 100,000 M.W.以上であることが示唆された。この結果より、培養上清中 PLA1 活性と PLC、LPLC 活性は異なる酵素による作用であることが示唆された。

第3章では、培養上清からの各リン脂質分解酵素の精製について示した。PLA1 では透析における外液としてリン酸緩衝液および K28 培地を用いた際に活性が残存し、蒸留水を用いた際には失活することが確認された。また、PLC および LPLC では透析における外液として K28 培地を用いた際にのみ活性が残存し、リン酸緩衝液および K28 培地を用いた際には失活することが確認された。そこで、タンパク質に適しているリン酸緩衝液を外液に用いても活性が残存する PLA1 のみの精製を進めることにした。培養上清の硫酸分画を行ったところ、

30~50%飽和画分および 50~80%飽和画分に PLA1 活性が確認された。この PLA1 活性が確認された 30~80%飽和画分を採取し、2 回のゲルろ過クロマトグラフィーにより精製を行い、PLA1 活性画分を SDS-PAGE により分析したところ、fr.33、fr.34 において分子量約 3 万に単一のバンドが確認され、PLA1 の単離が確認された。また、この結果より本 PLA1 は分子量約 3 万であると推定された。単一のバンドが確認された fr.33 中の PLA1 の N 末端アミノ酸配列を分析した結果、*Moritella* sp. HFHI0014 の有する PLA1 の N 末端アミノ酸配列は KASEFITIGTGGVTGVYYPA であることが確認された。また、BLAST を用いた本 PLA1 の N 末端アミノ酸配列の相同性検索の結果、高い相同性を示す既知の PLA1 は確認されず、本 PLA1 は新規のアミノ酸配列をもつ PLA1 であることが示唆された。また、本 PLA1 は精製後に比活性の向上がみられなかったことから、酵素活性安定性の保持に課題があると考えた。

第 4 章では、精製した PLA1 の諸性状について示した。精製 PLA1 のリン脂質のアシル基への作用位置を調べたところ、sn-2 位の脂肪酸が反応後の LPC に高濃度で残存していることから、精製 PLA1 においても培養上清と同様に sn-1 位の脂肪酸が選択的に加水分解されていることが確認された。精製 PLA1 と培養上清の反応速度を調べたところ、培養上清に比べ、精製 PLA1 の K_m 値は低かった。これより、精製することで PLA1 と PC の親和性が高まったことが示唆された。精製 PLA1 の熱安定性を調べたところ、培養上清中 PLA1、精製 PLA1 ともに 50℃、10 min の加熱で失活した。この結果より、本 PLA1 は現在市販されている *Aspergillus* sp. や *Fusarium* sp. 由来の PLA1 とは異なり、熱による反応のコントロールが容易にできる新規の PLA1 として有用性が高いと考えられる。精製 PLA1 の至適温度を調べたところ、培養上清中 PLA1 および精製 PLA1 ともに 10℃という低温で最も高い活性を示した。この結果より、低温において食感や物性等の改質を行うことが望ましい食品等に用いる際には、既存の PLA1 と比較すると有利であることが考えられる。精製 PLA1 の基質特異性を調べたところ、培養上清、精製 PLA1 ともに PC への特異性が高いことが確認された。PC は天然界に最も多く存在するグリセロリン脂質であることから、食品用途や化粧品用途に最もよく用いられている大豆や卵黄中においてもリン脂質の中で最も含有量の多い PC を効率よく加水分解するという特徴は食品用途への応用に有用であるものであると考えられる。PLA1 と PC との反応に対する PE、PG の影響を調べたところ、PG、PE は PC と競合的に PLA1 に結合するが特異性の違いから、PE、PG が加水分解されないことで、PC の競合阻害剤的な役割を果たしていることが示唆された。精製 PLA1 の金属イオンの影響について調べたところ、 Mg^{2+} を加えた際に PLA1 活性が向上する傾向がみられた。また、 Ca^{2+} を加えた際には活性が減少し、 Fe^{3+} を加えた際には活性はみられなかった。これより、本 PLA1 は Ca^{2+} および Fe^{3+} により阻害をうけることがわかった。PLA1 および PLA2 には Ca^{2+} により活性が向上するものは多くあるが、本 PLA1 は Ca^{2+} により阻害を受けるため、これらの酵素とは異なる性質をもつことが示唆された。本 PLA1 活性を安定的に保持することのできる精製条件をリン酸緩衝液中に各種の安定剤を加えることで検討した。PLA1 の安定剤の検討を行った結果、グリセリンを加えた際に活性の低下が抑制された。この結果より、グリセリンを緩衝液に加えることで、新規な特徴を持つ本 PLA1 の効率的な精製が可能であることが示された。

第5章では、HFHI0014株からPLA1をコードする遺伝子を取得するための検討について示した。既知のPLA1遺伝子配列の相同性検索を行い、相同性がみられた領域のアミノ酸配列をもとに作製したプライマーを用いたHFHI0014株のPCRを行ったところ、DNA断片の増幅はみられず、既知のPLA1遺伝子配列における相同性の高い2つの領域はHFHI0014株のDNAにはどちらか一方もしくは両方が存在しないことが示唆された。HFHI0014株の有するPLA1のN末端アミノ酸配列より作製したプライマーを用いたHFHI0014株DNAのPCRを行ったところ、多くのDNA断片の増幅がみられた。PCR産物をコンピタントセルに導入したところ、PCR産物が結合したTvectorを導入しているとみられる63株の白いコロニーを取得した。この63株の白いコロニーのインサートの確認をしたところ、3株のみにインサートが確認され、この3株の塩基配列を解析したが、既知のPLA1と相同性の高いものではなく、本PLA1遺伝子断片と推定されるものを取得することはできなかった。HFHI0014株DNAのコスミドライブラリーからリン脂質を含む寒天培地PCY改により約10000株のスクリーニングを行ったところハコを形成する菌株を見出すことはできなかった。また、6本のグリセロールストックから培養した大腸菌の菌体内タンパク質を抽出し、卵黄PCと作用させたところ、2本のグリセロールストックにPLA活性が検出された。グラム陰性菌である*Serratia* MK-1由来PLA1を大腸菌にて発現させたところ、菌体外に比べ菌体内のPLA1の分泌量が多いという報告があり³⁸⁾、本PLA1にもその傾向がみられた。しかしながら、現在数百株が混在した状態での活性試験においてPLA活性が認められた段階であり、今後、単菌レベルでの菌体内タンパク質の抽出を行い、活性試験を行うことでPLA1活性を発現する大腸菌を取得することができ、PLA1遺伝子の解析を行うことができると考えている。

以上の結果より、*Moritella* sp.の有するPLA1、PLC、LPLCは低温で高い活性を有し、熱による反応のコントロールが容易であるという、現在、市販されているホスホリパーゼには無い特徴をもち、産業に応用することでホスホリパーゼの新たな用途での開発が期待される。1-4に示したように高温下では酸化により劣化するリン脂質の改質には低温で働くホスホリパーゼは適しており、高度不飽和脂肪酸の酸化を抑えた食品やタンパク質の変性を抑える必要のある食品加工に有用である。

また、本PLA1はHFHI0014株培養上清中からは硫安分画とゲルろ過クロマトグラフィーという比較的簡便な方法によって精製が可能であり、簡便な精製は産業利用においてもコストの軽減につながり大変有用であると考えられる。さらに、本PLA1の精製における安定性は10%グリセリンにより保持されることが期待され、グリセリンという比較的安全な物質により効率的な精製が行うことが可能であることも利点である。また、本PLA1のN末端アミノ酸配列は既知のPLA1と高い相同性を示さなかったことから、本PLA1は新規の配列をもつことが示唆された。また、本PLA1は精製後の性状は培養上清中と大きな違いはみられず、本PLA1の低温で高い活性を有し、比較的低温下で失活するという有用な性状も失われておらず、精製PLA1も低温において食感や物性等の改質を行うことが望ましい食品等に用いることが適していると考えられる。

本実験では、HFHI0014株からPLA1をコードする遺伝子を取得することができなかった。

しかしながら、本 PLA1 遺伝子が既知の PLA1 遺伝子と高い相同性を示さないことが示唆され、HFHI0014 株より PLA1 遺伝子を取得するには既知の PLA1 配列を用いた実験は適さないことが示唆された。また、HFHI0014 株の DNA 断片を導入した大腸菌の菌体内タンパク質には PLA1 活性がみられ、今後、単菌レベルでの菌体内タンパク質から活性試験を継続することで、PLA1 活性を発現する大腸菌を取得することができると考えている。

今後の課題としては、まず、本論文では見出すことのできなかった PLC、LPLC の精製に適した条件の検討があげられる。また、PLA1、PLC、LPLC 活性を発現する宿主菌の取得および遺伝子配列の解析、大量発現法の確立などがあげられる。このような課題を達成し、低温下で優れた活性を示す本ホスホリパーゼを産業に応用することで、現在では不可能な新たなリン脂質の改質法を実現し、ヘルスフードを含めた食品の更なる発展の一助となることを期待している。

参考文献

- 1) Chan D.C., Barrett H.P., Watts G.F., Dyslipidemia in visceral obesity: mechanisms, implications, and therapy. *Am. J. Cardiovasc. Drugs*, 4(4), 227-246 (2004).
- 2) 厚生労働省健康局総務課生活習慣病対策室, 平成 16 年国民健康・栄養調査結果の概要. 厚生労働省ホームページ (<http://www.mhlw.go.jp/houdou/2006/05/h0508-1a.html>).
- 3) 矢澤 一良, ヘルスフード科学講座, 食品化学新聞社 (2007).
- 4) 矢澤 一良 編著, “水産・海洋ライブラリ 9”, 成山堂書店 (2003).
- 5) 家森 幸男, 太田 静行, 渡邊 晶 編, 大豆イソフラボン, 幸書房 (2001).
- 6) Igarashi, K., Honma, K., Yoshinari, O., Nanjo, F., Hara, Y., Effects of Dietary Catechins on glucose tolerance, blood pressure and oxidative status in Goto-Kakizaki rats, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 53, 496-500 (2007).
- 7) 矢澤 一良, 中高年の脳力アップにイチヨウ葉エキス, ハート出版 (1998).
- 8) Clare, D.A., Swaisgood, H.E., Bioactive milk peptides: a prospectus, *J. Dairy Sci.*, 83, 1187-1195 (2000).
- 9) 末綱 邦男, 新規なかつお節ペプチド、L-バリループロリン及び血圧降下剤, 特許公開 2007-182414 (2007).
- 10) 矢澤 一良, マリンビタミンと脳機能賦活, オレオサイエンス, 6, 85-92 (2006).
- 11) 日本生化学会編, “新生化学実験講座 4”, 東京化学同人, p.7 (1991).
- 12) Monteleone, P.L., Beinart, C., Tanzillo, M., Maj, D., Kemali, Effects of phosphatidylserine on the neuroendocrine response to physical stress in humans., *Neuroendocrinology*, 52, 243-248 (1990).
- 13) Lieber, C.S., Pathogenesis and treatment of alcoholic liver disease, progress over the last 50 years., *Rocz. Akad. Med. Białymst.*, 50, 7-20 (2005).
- 14) Jäger, R., スポーツ栄養剤におけるホスファチジルコリンの用途, *FOOD STYLE* 21, 6, 7 (2002).
- 15) Amaducci, L., Phosphatidylserine in the treatment of Alzheimer's disease, results of a multicenter study., *Psychopharmacol. Bull.*, 24, 130-134 (1988).
- 16) Crook, T., Petrie, W., Wells, C., Massari, D.C., Effects of phosphatidylserine in Alzheimer's disease., *Psychopharmacol. Bull.*, 28, 61-66 (1992).
- 17) Nerozzi, D., Aceti, F., Melia, E., Magnani, A., Marino, R., Genovesi, G., Amalfitano, M., Cozza, G., Murgiano, S., De Giorgis, G., Phosphatidylserine and memory disorders in the aged., *La Clinica Terapeutica*, 120, 399-404 (1987).
- 18) Furushiro, M., Suzuki, S., Shishido, Y., Sasaki, M., Yamatoya, H., Kudo, S., Hashimoto, S., Yokokura, T., Effects of oral administration of soybean lecithin transphosphatidylated phosphatidylserine on impaired learning of passive avoidance in mice., *Jpn. J. Pharmacol.*, 75, 447-450 (1997).

- 19) Brambilla, F., Maggioni, M., Panerai, E. A., Sacerdote, P., Cenacchi, T., Beta-endorphin concentration in peripheral blood mononuclear cells of elderly depressed patients--effects of phosphatidylserine therapy., *Neuropsychobiology*, 34, 18-21 (1996).
- 20) Kidd, M.P., Alten, M.R., Parkinson's disease as multifactorial oxidative neurodegeneration, implications for integrative management., 5, 402-428 (2000).
- 21) Loeb, C., Benassi, E., Bo, G.P., Cocito, L., Maffini, M., Scotto, P., Preliminary evaluation of the effect of GABA and phosphatidylserine in epileptic patients. *Epilepsy Res.*, 1, 209-212 (1987).
- 22) Monteleone, P., Maj, M., Beinat, L., Natale, M., Kemali, D., Blunting by chronic phosphatidylserine administration of the stress-induced activation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in healthy men. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 42, 385-388 (1992).
- 23) Morizawa, K., Tomobe, Y.I., Tsuchida, M., Nakano, Y., Hibino, H., Tanaka, Y., Dietary Oils and Phospholipids Containing n-3 Highly Unsaturated Fatty Acids Suppress 2,4-Dinitro-1-fluorobenzene-induced Contact Dermatitis in Mice., *J. Jan. Oil. Chem Soc.*, 49, 59 (2000).
- 24) Hibino, H., Hashimoto, M., Gong, X.W., Izaki, Y., Iriki, M., 1-Oleoyl-2-docosahexaenoyl phosphatidylcholine increased paradoxical sleep in F344 rats., *Neuroscience Lett*, 158, 29-32 (1993).
- 25) Peng, L., Xu, X., Mu, H., Hoy, C.E., Adler, N.J., Production of structured phospholipids by lipase-catalyzed acidolysis, optimization using response surface methodology., *Enzyme Microb. Technol.*, 31, 523-532 (2002).
- 26) 柳澤 琢也, 奈良部 均, 坂口 裕之, 小林 英明, 第 43 回日本油化学会年会講演要旨集, p.236 (2004).
- 27) Yamano, Y., Ghotani, S., *Abstract of 4th World Surfactants Congress*, p.84 (1996).
- 28) Sugawara, T., Kushiro, M., Zhang, H., Nara, E., Ono, H., Nagao, A., Lysophosphatidylcholine enhances carotenoid uptake from mixed micelles by Caco-2 human intestinal cells., *J. Nutr.*, 131, 2921-2927 (2001).
- 29) Kwak, H., B, Lee, S., W., Li, Y.J., Kim, Y.A., Han, S.Y., Jhon, G.J., Kim, H.H., Lee, H. Z., Inhibition of osteoclast differentiation and bone resorption by a novel lysophosphatidylcholine derivative, SCOH., *Biochem. Pharm.*, 67, 1239-1248 (2004).
- 30) Thies, F., Pillon, C., Molière, P., Lagarde, M., Lecerf, J., Preferential incorporation of sn-2 lysoPC DHA over unesterified DHA in the young rat brain, *Am. J. Physiol.*, 267, R1273-R1279 (1992).
- 31) 八木 隆, 搾油・脱ガムの開発動向, オレオサイエンス, 6, 3-8 (2006).
- 32) Dahlke, K., Buchold, H., Munch, E.W., Paulitz, B., First experiences with enzymatic oil refining, *inform*, 6, 1284-91 (1995).

- 33) 合谷 祥一, 野々上浩一, 内田 典芳, 今榮東洋子, 古坂 道弘, 山野 善正, リゾリン脂質の界面活性に対するアシル基結合位置の影響, 第 35 回油化学討論会講演要旨集, p.192 (1996).
- 34) 秋 庸裕, 高度不飽和脂肪酸の生合成と生産に関する研究, オレオサイエンス, 5, 589-599 (2005).
- 35) Shibata, Y., Ono, C., Fukui, F., Watanabe, I., Serizawa, N., Gomi, K., Yoshikawa, H., High-level secretory production of phospholipase A1 by *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae*., *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 65, 94-101 (2001).
- 36) Shen, D.K., Noodeh, A.D., Kazemi, A., Grillot, R., Robson, G., Brugere, J. F., Characterisation and expression of phospholipases B from the opportunistic fungus *Aspergillus fumigatus*., *FEMS Microbiol. Lett.*, 239, 87-93 (2004).
- 37) Dekker, N., Tommassen, J., Lustig, A.J., Rosenbusch, P.H., Verheiji, M., Dimerization regulates the enzymatic activity of Escherichia coli outer membrane phospholipase A., *J. Biolog. Chem.*, 272, 6, 3179-3184 (1997).
- 38) Song, K.J., Kim, K.M., Rhee, S.J., Cloning and expression of the gene encoding phospholipase A₁ from *Serratia* sp. MK1 in Escherichia coli., *J. Biotechnol*, 72, 103-114 (1999).
- 39) Givskov, M., Molin, S., Secretion of *Serratia liquefaciens* phospholipase from *Escherichia coli*., *Mol. Microbiol.*, 8, 229-242 (1993).
- 40) Soldatova, L., Kochoumian, L., King, T.P., Sequence similarity of a hornet (*D. maculata*) venom allergen phospholipase A₁ with mammalian lipases., *FEBS Lett.*, 320, 145-149 (1993).
- 41) Higgs, N.H., Glomset, A.J., Purification and properties of a phosphatidic acid-preferring phospholipase A₁ from bovine testis. Examination of the molecular basis of its activation., *J. Biol. Chem.*, 271, 10874-10883 (1996).
- 42) Miyazawa, D., Ikemoto, A., Fujii, Y., Okuyama, H., Partial purification and characterization of phosphatidic acid-specific phospholipase A(1) in porcine platelet membranes., *Biochim. Biophys. Acta*, 1631, 17-25 (2003).
- 43) 矢澤 一良, 渡辺 和郎, 鎌田 正純, 村松 宏, ホスホリパーゼ A1 活性を有する細菌の培養液、ドコサヘキサエン酸高含有リン脂質の調製法及び 2-アシルリゾリン脂質の製造法, 特開平 10-323182 (1998).
- 44) 矢澤 一良, 渡辺 和郎, 鎌田 正純, ドコサヘキサエン酸及びホスホリパーゼ A1 を産生する微生物、ドコサヘキサエン酸の製造方法、微生物の培養液、ドコサヘキサエン酸高含有リン脂質の調製法及び 2-アシルリゾリン脂質の製造, 特開平 11-318434 (1999).
- 45) Song, K.W., Han, J.J., Rhee, S.J., Phospholipases Occurrence and production in microorganisms, assay for high-throughput screening and gene discovery from natural and man-made diversity., *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 82, 691-705 (2005).
- 46) Clausen, K., Enzymatic oil-degumming by a novel microvial phospholipase., *Eur. J.*

- Lipid Sci. Technol.*, 103, 333-340 (2001).
- 47) Dessen, A., Phospholipase A₂ enzymes , Structural diversity in lipid messenger metabolism., *Structure Fold Des.*, 8, R15-R22 (2000).
 - 48) Betzel, C., Genov, N., Rajashankar, K.R., Singh, T. P., Modulation of phospholipase A₂ activity generated by molecular evolution., *Cell Mol. Life Sci.*, 56, 384-397 (1999).
 - 49) Valentin, E., Lambeau, G., What can venom phospholipases A₂ tell us about the functional diversity of mammalian phospholipases A₂, *Biochimie*, 82, 815-831 (2000).
 - 50) Hirano, K., Okada, E., Tanaka, T., Satouchi, K., Purification and regiospecificity of multiple enzyme activities of phospholipase A(1) from bonito muscle., *Biochim. Biophys. Acta*, 1483, 324-333 (2000).
 - 51) 名倉 猛夫, 長寿社会で注目される α -GPC (グリセロホスホコリン), *FOOD STYLE* 21, 9, 10 (2005).
 - 52) Rhee, S.G., Suh, P.G., Ryu, S.H., Lee, S.Y., Studies of inositol phospholipid-specific phospholipase C., *Science*, 244, 546-550 (1989).
 - 53) Gerfen, C.R., Choi, W.C., Sue, P.G., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 85, 3208 (1988).
 - 54) Ohta, S, Matui, A., Nozawa, Y., Kagawa, Y., Complete cDNA encoding a putative phospholipase C from transformed human lymphocytes., *FEBS Lett*, 242, 31-35 (1988).
 - 55) Slein, M.W., Logan, G.F., Jr., Characterization of the Phospholipases of *Bacillus cereus* and Their Effects on Erythrocytes, Bone, and Kidney Cells., *J. Bacteriol.*, 90, 69-81 (1965).
 - 56) Tan, C.A., Hehir, M.J., Roberts, M.F., Cloning Overexpression ,Refolding and Purification of the Nonspecific Phospholipase C from *Bacillus cereus*., *Protein Expr. Purif.*, 10, 365-372 (1997).
 - 57) Iwasaki, Y., Niwa, S., Nakano, H., Nagasawa, T., Yamane, T., Purification and Properties of Phosphatidylinositol-Specific Phospholipase C from *Streptomyces antibioticus*., *Biochim. Biophys. Acta*, 1214, 221-228 (1994).
 - 58) Preuss, I, Kaiser, I, Gehring, U, Molecular Characterization of a Phosphatidylcholine-Hydrolyzing Phospholipase C, *Eur. J. Biochem.*, 268, 5081-5091 (2001).
 - 59) Okabe, A, Shimizu, T, Hayashi, H, Cloning and Sequencing of a Phospholipase C Gene of *Clostridium perfringens*., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 160, 33-39 (1989).
 - 60) グラマティコヴァ スヴェトラナ, ヘイズルウッド ジョフ, ラム デイヴィッド, バートン ネルソン, ホスホリパーゼ、それらをコードする核酸、ならびに、それらの作製方法および使用方法, 特許公表 2005-523019 (2005).

- 61) Singer, W.D., Brown, H.A., Sternweis, P.C., Phosphatidylinositol-specific phospholipase C and D., *Annu. Rev. Biochem*, 66, 475-509 (1997).
- 62) Juneja, L.R., Kazuoka, T., Goto, N., Yamane, T., Shimizu, S., Conversion of phosphatidylcholine to phosphatidylserine by phospholipase D., *Biochim. Biophys. Acta*, 1003, 277-283 (1989).
- 63) Jones, C.S., Shankaran, S., Davidson, D.J., Poulos, A., Callahan, J.W., Studies on the structure of sphingomyelinase. Amino acid composition and heterogeneity on isoelectric focusing., *Biochem. J.*, 209, 291-297 (1983).
- 64) Doery, H.M., Magnusson, B.J., Gulasekharan, J., Pearson, J.E., The properties of phospholipase enzymes in staphylococcal toxins., *J. Gen. Microbiol*, 40, 283-96, (1965).
- 65) Ikezawa, H., Mori, M., Ohyabu, T., Taguchi, R., Studies on sphingomyelinase of *Bacillus cereus*. I. Purification and properties., *Biochim. Biophys. Acta*, 528, 247-256 (1978).
- 66) 高橋 日出彦, 波羅 進, 富谷 由美子, 赤血球を原料とするスフィンゴミエリンおよびセラミドの新規製造方法とセラミド配合治療剤又は化粧品, 特開平 8-294395
- 67) 星野 保, 石崎 紘三, 湯本 勲, 扇谷 悟, 低温活性プロテアーゼ及びその製法, 特第 2873936 号
- 68) Nakagawa, T., Nagaoka, T., Taniguchi, S., Miyaji, T., Tomizuka, N., Isolation and characterization of psychrophilic yeasts producing cold-adapted pectinolytic enzymes., *Microbiology*, 38, 383-387 (2004).
- 69) Elend, C., Schmeisser, C., Hoebenreich, H., Steele, H.L., Streit, W.R., Isolation and characterization of a metagenome-derived and cold-active lipase with high stereospecificity for (*R*)-ibuprofen esters., *Biotechnology*, 130, 370-377 (2007).
- 70) 内田 典芳, 服部 惇, ホスホリパーゼ A1 とその利用, 特許公開平 7-31472 (1995)
- 71) 西原 政晃 著, 修士学位論文 有用酵素の探索とその応用, 東京海洋大学(2006).
- 72) Maria, De, L., Vind, J., Oxenboll, K. M., Svendsen, A., Patkar, S., Phospholipases and their industrial applications, *Appl Microbiol Biotechnol*, 74, 290-300 (2007).
- 73) 山根 恒夫, ホスファチジルセリンの酵素合成, ホスファチジルセリン研究会会報, 1, 9-13 (2003).
- 74) Roberts, I.N., Jeenes, D.J., MacKenzie, D.A., Wilkinson, A.P., Sumner, I.G., Archer, D.B., Heterologous gene expression in *Aspergillus niger* of a glucoamylase-porcine pancreatic phospholipase A2 fusion protein is secreted and processed to yield mature enzyme, *Gene*, 122, 155-161 (1992).
- 75) Watanabe, I., Koishi, R., Yoshio, Y., Tsuji, T., Serizawa, N., Molecular cloning and expression of the gene encoding a phospholipase A₁ from *Aspergillus oryzae*., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63, 820-826 (1999).

- 76) Zambonelli, C., Morandi, P., Vanoni, M.A., Tedeschi, G., Servi, S., Curti, B., Carrea, G., Lorenzo, R.D., Monti, D., Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding *Streptomyces* PMF PLD, a phospholipase D with high transphosphatidylase activity, *Enzyme and Microbial Technology*, 13, 676-688 (2003).
- 77) Ogino, C., Kanemasu, M., Hayashi, Y., Kuroda, S., Kondo, A., Shimizu, N., Tanizawa, K., Fukuda, H., Over-expression system of phospholipase D from actinomycete by *Streptomyces lividans*, *Appl. Microbiol. Biotech.*, 64, 823-828 (2004).
- 78) Folch, J., Ascoli, I., Lees, M., Meath, J.A., LeBaron, F.N., Preparation of lipid extracts from brain tissue., *J. Biol. Chem.*, 191, 883 (1951).
- 79) 高橋 雅夫 編, 『化粧品原料と製品技術』, シーエムシー出版 (2003).
- 80) 奥積 昌世, 藤井 建夫 編, イカの栄養・機能成分, 成山堂書店 (2000).
- 81) 永井 裕, 石倉 久之, 林 利彦 訳, シーゲル・生化学計算法 第2版, 廣川書店 (1979).
- 82) By Novozymes Japan.
- 83) 田村 隆明 著, バイオ試薬調製ポケットマニュアル, 羊土社, p37-38 (2004).
- 84) Laemmli, U. K., Cleavage of Structural Proteins during the Assembly the Head of Bacteriophage T4, *Nature*, 227, 680-685 (1970).
- 85) Matsudaira, P, Sequence from Picomole Quantities of Proteins Electrophoretically Blotted onto Polyvinylidene Difluoride Membranes., *Biological Chemistry*, 10035-10038 (1987).
- 86) Rabus, R., Donald, L.J., David, J.K., Milton, H.S.Jr., TRAP transporters: an ancient family of extracytoplasmic solute-receptor-dependent secondary active transporters., *Microbiology*, 145, 3431-3445 (1999).
- 87) Nieuwenhuizen, W., Steenbergh, P., de Haas, G.H., The isolation and Properties of Two Prephospholipase A₂ from porcine pancreas., *Eur. J. Biochem.*, 40, 1-7 (1973).
- 88) Aid, S., Bosetti, F., Gene expression of cyclooxygenase-1 and Ca²⁺-independent phospholipase A₂ is altered in rat hippocampus during normal aging., *Brain Research Bulletin*, 73, 108-113 (2007).

謝 辞

本論文の完成は指導教授でありますヘルスフード科学（中島董一郎記念）寄附講座 矢澤一良客員教授ならびに小山智之客員准教授の忍耐強いご指導とご鞭撻の賜りであり、ここに深甚なる感謝の意を表します。

本論文をまとめるに際し、暖かいご激励と懇切なるご審査を頂きました食品保全機能学 長島祐二教授に対し、ここに深謝致します。

本研究を実施する際及び本論文をまとめるに際し、きめ細やかなご指導とご激励を頂きました山野美容芸術短期大学の鎌田正純博士に厚く御礼申し上げます。

N 末端アミノ酸配列解析において、多大なるご協力を頂きました東京大学大学院農学生命科学研究科 渡部終五教授に深く感謝の意を表します。

本研究を行うに当たり、ご助力頂きましたゲノム科学講座 廣野育生准教授ならびにゲノム科学講座の皆様に深く感謝の意を表します。

本研究を行うにあたり、多大なる配慮をいただき、励ましてくださいました湘南予防医科学研究所 大塚伊津子主任研究員ならびに三瓶英子氏、輿石君子氏に厚く御礼申し上げます。

ヘルスフード科学（中島董一郎記念）寄附講座運営に当たり、多大なるご支援とご協力を頂きました株式会社中島董商店、キューピー株式会社に深く感謝の意を表します。

最後に、研究を行っていくに際し多大なる助言及び協力を頂きましたグループリーダーの西原政晃さんならびに研究室の皆様に感謝致します。